

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Allergologie der Ludwig- Maximilians-
Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**AKTIVIERUNG DES AIM2 INFLAMMASOMS IN
MENSCHLICHEN KERATINOZYTEN DURCH
BIENENGIFT**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität zu München

Vorgelegt von

Nikolay Kaymakanov

aus Plovdiv

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Schaubert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ludger Klein
Prof. Dr. Wilhelm Stolz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 6 |
| 1.1 | Das Immunsystem | 6 |
| 1.1.1 | Grundsätze des angeborenen Immunsystems | 6 |
| 1.1.2 | Grundsätze des adaptiven Immunsystems | 7 |
| 1.1.3 | Komplexität des angeborenen Immunsystems | 8 |
| 1.1.4 | Toll-like Rezeptoren | 10 |
| 1.1.5 | RIG-like Helicasen | 12 |
| 1.1.6 | NOD-like Rezeptoren | 12 |
| 1.1.7 | NOD Signalosome | 14 |
| 1.1.8 | Die Inflammasome..... | 15 |
| 1.1.9 | AIM2..... | 17 |
| 1.2 | Bienengift..... | 20 |
| 1.3 | Fragestellung der Arbeit | 25 |
| 2 | Material und Methoden | 27 |
| 2.1 | Material..... | 27 |
| 2.1.1 | Zellen und Zellkulturexperimente | 27 |
| 2.1.2 | Behandlung mit Bienengift..... | 28 |
| 2.1.3 | Behandlung mit Bienengift-Bestandteile..... | 28 |
| 2.1.4 | Analyse der Zellsignalwege..... | 28 |
| 2.1.5 | Ex-Vivo Experimente mit Hautstanzen | 29 |
| 2.1.6 | HE Färbung..... | 30 |
| 2.2 | Analysemethoden | 31 |
| 2.2.1 | Interleukin 1 β ELISA | 31 |
| 2.2.2 | RNA Extraktion | 32 |
| 2.2.3 | cDNA Synthese | 33 |
| 2.2.4 | Semi-quantitative Real Time PCR (RT-PCR) | 34 |
| 2.2.5 | Gelelektrophorese | 34 |
| 2.2.6 | Western Blot | 35 |
| 2.2.6.1 | Proteinisolierung aus Überstand von NHEK Zellkultur | 35 |
| 2.2.6.2 | Proteinisolierung aus NHEK Zelllysate..... | 35 |
| 2.2.6.3 | Proteinkonzentrationsmessung | 36 |
| 2.2.6.4 | Elektrophorese | 36 |
| 2.2.6.5 | Blotting | 36 |
| 2.2.6.6 | Ponceau Färbung..... | 37 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.6.7 | Nachweis des gesuchten Proteins | 37 |
| 2.2.6.8 | Kontrolle der Beladung..... | 38 |
| 2.2.7 | Messungen der Zytotoxizität | 38 |
| 2.2.7.1 | LDH-Test | 38 |
| 2.2.7.2 | CellTiterBlue | 39 |
| 2.2.7.3 | Kristallviolett Färbung | 39 |
| 2.2.8 | Apoptosebestimmung von NHEK | 40 |
| 2.2.8.1 | Theoretischer Hintergrund der Annexin V-Propidiumjodid Doppelfärbung..... | 40 |
| 2.2.8.2 | FACS-Analyse | 42 |
| 2.3 | Statistische Auswertung | 43 |
| 3 | Ergebnisse..... | 44 |
| 3.1 | Bienengift induziert IL-1 β Ausschüttung <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> | 44 |
| 3.2 | Die IL-1 β Sekretion lässt sich durch Ausschalten von Caspase 1 und AIM2 hemmen..... | 50 |
| 3.3 | Die Inflammasom- Aktivierung geschieht ASC-unabhängig..... | 54 |
| 3.4 | Die im Überstand gelöste DNA ist nicht für die AIM2-Aktivierung verantwortlich | 55 |
| 3.5 | ASC-siRNA induziert die Expression von AIM2..... | 57 |
| 3.6 | Bienengift verursacht Apoptose | 59 |
| 3.7 | Die Aktivierung des Inflammasoms geschieht durch Melittin | 62 |
| 3.8 | Die IL-1 β -Sekretion der Keratinozyten nach Behandlung mit Melittin erfolgt AIM2-abhängig | 65 |
| 4 | Diskussion | 67 |
| 4.1 | Die Inflammasome..... | 67 |
| 4.2 | Funktionen der Inflammasome in der Haut | 69 |
| 4.3 | Wirkungen des Bienengifts auf den menschlichen Organismus..... | 71 |
| 4.4 | Inflammasome und Bienengift | 72 |
| 4.5 | Induktion von IL-1 β -Sekretion durch Bienengift | 72 |
| 4.6 | Hautmodell für Bienenstiche | 74 |
| 4.7 | Die Toxizität von Bienengift | 75 |
| 4.8 | Aktivierung des AIM2 Inflammasoms durch Bienengift | 75 |
| 4.9 | Induktion von Apoptose durch Bienengift | 78 |
| 4.10 | Beteiligung der einzelnen Bienengift-Bestandteile an der Aktivierung des AIM2-Inflammasoms | 80 |
| 4.11 | Bedeutung der Ergebnisse..... | 81 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5 | Zusammenfassung..... | 83 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 87 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis | 92 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 94 |
| 9 | Danksagung | 110 |

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Alle höheren Lebewesen verfügen über Strukturen und Mechanismen, die der Abwehr gegen Mikroorganismen, fremde Substanzen oder fehlerhaft gewordene körpereigene Zellen dienen. Die Gesamtheit der Organe, Zellen, Substanzen und Moleküle, die diese Aufgabe erfüllen, wird Immunsystem genannt. Die grundlegende Eigenschaft des Immunsystems ist die Unterscheidungsfähigkeit zwischen eigen und fremd. Im Folgenden wird genauer auf die Besonderheiten der menschlichen Immunität, die aus Sicht der Evolution die höchste Stufe darstellt, eingegangen.

1.1.1 Grundsätze des angeborenen Immunsystems

In der Stammesgeschichte der Lebewesen entstand als Erstes das so genannte angeborene oder unspezifische Immunsystem. Viele seiner Bestandteile und Mechanismen sind über lange Zeit und bei vielen Spezies unverändert geblieben. Wie schon der Name andeutet, steht es von Geburt an sofort zur Verfügung und trägt dazu bei, dass Organismen die vulnerable postnatale Phase des Lebens überstehen. Außerdem gewährleistet es eine besonders schnelle Reaktion auf schädliche Einflüsse und leitet die entsprechenden Mechanismen für die Vorbereitung der spezifischen Abwehr ein. Zu dem angeborenen Immunsystem zählen einerseits nicht-zelluläre Faktoren wie das Komplementsystem, Lysozyme, antimikrobielle Peptide und andere (u.a.), andererseits verschiedene Zellarten. Als allererster Eindringenschutz des Körpers dienen die Epithelien der Haut, des Gastrointestinaltrakts und des Urogenitaltrakts, die nicht nur eine passive Barriere gegen Strahlen, Chemikalien und Mikroorganismen darstellen, sondern auch sehr schnell eine aktive Abwehr gegen Eindringlinge in Gang setzen können. Es gibt immer mehr

Studien, die zeigen, dass nicht nur die in der Haut lokalisierten dendritischen Zellen und Makrophagen dafür verantwortlich sind, sondern auch die Keratinozyten selber (1)-(3). Sollte dieser Schutz nicht ausreichend sein, stehen weitere spezialisierte Immunzellen der angeborenen Immunität zur Verfügung: Granulozyten, Monozyten, Natürliche Killer (NK)-Zellen, Mastzellen usw. Die allermeisten Infektionen werden auf diesem Wege schnell und ohne die Beteiligung des adaptiven Immunsystems bekämpft.

1.1.2 Grundsätze des adaptiven Immunsystems

Die oben genannten (o.g.) Zellen setzen, solange sie im Einsatz sind, pro-inflammatorische Mediatoren frei, die bei bestimmten Bedingungen das phylogenetisch neuere, adaptive Immunsystem aktivieren. Es wird adaptiv genannt, weil es in der Lage ist, sich den Erregern genau anzupassen und eine möglichst effektive Abwehr anzubieten. Im Unterschied zum angeborenen Immunsystem braucht das adaptive zwischen drei und sieben Tagen, bevor seine Zellen mit der Bekämpfung der schädlichen Einflüsse anfangen. Zu diesen Zellen gehören T- und B- Lymphozyten. Sie sind in der Lage, durch somatische Rekombination und Hypermutation, spezifische Rezeptoren und Antikörper für eine praktisch unendlich große Anzahl von Antigenen zu bilden (4). Dieser Prozess dauert länger und ist für die konkrete Situation hinsichtlich Erregertyp, Lokalisation und Anzahl von Antigenen spezifisch. Diese Art von Immunität wird auch erworben genannt, da sie erst im Laufe des Lebens voll funktionsfähig wird. Sie wird nur bei Infektionen eingesetzt, die lange genug persistieren, um die Anpassungsprozesse stattfinden zu lassen. Dabei werden zwei Signale benötigt: einerseits die von dem angeborenen Immunsystem ununterbrochen freigesetzten Zytokine und andererseits Antigene, die von den Antigenpräsentierenden Zellen (APC) mithilfe von ihren Major histocompatibility complex (MHC) Klasse II Rezeptoren T- und B-Lymphozyten präsentiert werden. T-Lymphozyten sind für die zelluläre, B-Zellen für die humorale Abwehr verantwortlich. Eine weitere, sehr wichtige Funktion, die beide Zellarten

vermitteln, ist das immunologische Gedächtnis. Es führt dazu, dass Mikroorganismen, denen der menschliche Körper einmal ausgesetzt war, bei Neuinfektion schneller und effektiver erkannt und bekämpft werden. Auf dieser Fähigkeit basiert eine der erfolgreichsten Methoden der modernen Medizin: die aktive Impfung (7).

1.1.3 Komplexität des angeborenen Immunsystems

Im Unterschied zu den Lymphozyten können die Zellen des angeborenen Immunsystems ihre Rezeptoren den verschiedenen Erregern nicht anpassen. Trotzdem erkennen sie zuverlässig und effektiv eine sehr breite Palette von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen. Dies geschieht durch so genannte (sog.) PRR- Rezeptoren (Mustererkennende Rezeptoren; engl. pattern recognition receptors), die von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, Epithelzellen u.a. exprimiert werden. Sie sind auf die Erkennung von hochkonservierten Strukturen von Pathogenen- den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) - ausgerichtet. Theoretisch könnte ein Mikroorganismus der Immunantwort des angeborenen und auf diese Weise auch des spezifischen Immunsystems entgehen, indem er seine charakteristischen Merkmale ändert. Im Laufe der Evolution wurden aber Rezeptoren für solche PAMPS selektiert, die für die Erreger unentbehrlich und dementsprechend auch kaum veränderbar sind. Werden die Immunzellen aktiviert, setzen sie Zytokine und Chemokine frei, die unter anderem weitere Zellen (z.B. neutrophile Granulozyten) an den Ort des Geschehens locken- ein Prozess, der Chemotaxis genannt wird (8),(9). Dieses Modell erklärt jedoch nicht, wie die gefährlichen von den harmlosen, ubiquitär vorkommenden Mikroorganismen unterschieden werden. Nach einer neueren Theorie ist die Anwesenheit von fremdem Material im Körper nicht ausreichend, um eine Immunantwort auszulösen. Zusätzlich dazu werden Signale gebraucht, die auf eine Gefahr für die Zellen deuten, sog. Gefahr-assoziierte molekulare Muster

(eng. danger-associated molecular patterns, DAMPs) (10),(11). Solche Stoffe werden bei Schädigung von Zellen freigesetzt und sind oft allein ausreichend, um das unspezifische Immunsystem zu aktivieren. Auf diese Weise kann es zu einer „sterilen Infektion“ kommen. Das ist z.B. beim Eindringen und der Akkumulation von Quarz- oder Uratkristallen im Gewebe der Fall (12).

PRRs können zytosolisch, an die Zell- oder endosomale Membran gebunden sein oder in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Es existieren viele verschiedene Typen von PRRs: Toll-like Rezeptoren (TLR) (13), NOD (Nucleotide Oligomerization Domain)-like Rezeptoren (NLR) (14), RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) like Helicasen (RLH) (15), C-type Lectine (16), DAI (DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors; auch DLM-1 und ZBP1 genannt) (17), und der neu entdeckte zytosolische DNA-Rezeptor absent in melanoma 2 (AIM2) aus der hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats (HIN200) Familie (18). Die verschiedenen Rezeptor-Familien haben zum Teil unterschiedliche Aufgaben aber auch viele gemeinsame Zuständigkeiten und interagieren oft synergistisch. Strukturell gesehen, bestehen sie aus bestimmten Bausteinen, genannt Domänen. Essenzielle Bestandteile all dieser Rezeptoren sind die Signalerkennungs- und die Effektordomäne (19). In Tabelle 1 sind Beispiele für Liganden der jeweiligen Rezeptoren aufgelistet.

| PRR | Liganden |
|------------|--|
| TLR1 | Bakterielle Lipoproteine |
| TLR2 | Bakterielle Lipoproteine, Lipoteicholsäure |
| TLR3 | Virale dsRNA |
| TLR4 | Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) |
| TLR5 | Bakterielle Flagelline |
| TLR6 | Bakterielle Lipoproteine |
| TLR7 | Virale ssRNA, Imidazoquinolin-Derivate |
| TLR8 | GU-reiche virale ssRNA |
| TLR9 | Nichtmethylierte/Hypomethylierte CpG DNA |
| RLH | Virale dsRNA |
| NALP1 | Muramyl Dipeptide (MDP), anthrax lethal toxin (LT) |
| NALP3 | MDP, bakterielle RNA, LPS, Pam2CysK4, poly(I:C), Imidazoquinolin-Derivate, Nigericin, Listeriolysin O, Aerolysin, Maitotoxin, ATP, Urat- |
| NALP4 | Zytosolisches Flagellin |
| NOD1 | Meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP) (Glykoprotein) |
| NOD2 | Muramyldipeptid (MDP) (Glykoprotein) |
| AIM2 | Intrazelluläre doppelsträngige DNA |

TABELLE 1: Pattern Recognition Receptors und ihre Liganden

1.1.4 Toll-like Rezeptoren

Die am besten erforschten PRRs sind die Toll-like Rezeptoren. Der Name ist abgeleitet von Proteinen, die Anfang der achtziger Jahre von der Forschungsgruppe um die Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard bei *Drosophila* Fliegen entdeckt und „Toll“ genannt wurden (20),(21). Bei Säugetieren wurden bisher 12 Vertreter dieser Familie identifiziert. Sie werden entweder an der Zellmembran (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 and 11) oder an der endosomalen Membran (TLR3, 7, 8, and 9) exprimiert. Dementsprechend sind sie für die Erkennung verschiedener PAMPs verantwortlich: diejenigen, die an der Zellmembran gebunden sind, erkennen bakterielle Komponenten und die intrazellulären TLR- verschiedene Nukleinsäuren (22). Die Aktivierung der

Rezeptoren führt über verschiedene Signalwege zu der Induktion von den Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und IRF-3. Dies erzielt vielseitige Effekte: Produktion von antimikrobiellen Peptiden, inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Adhäsionsfaktoren, sowie Hochregulierung von MHC-s (Major Histocompatibility Complexes) (23). Ein Erreger aktiviert meistens mehrere TLRs und dementsprechend werden verschiedene Proteine in spezifischer Kombination gebildet. Dadurch ist das Immunsystem in der Lage zu erkennen, um was für einen Mikroorganismus es sich handelt und optimal gegen diesen vorzugehen.

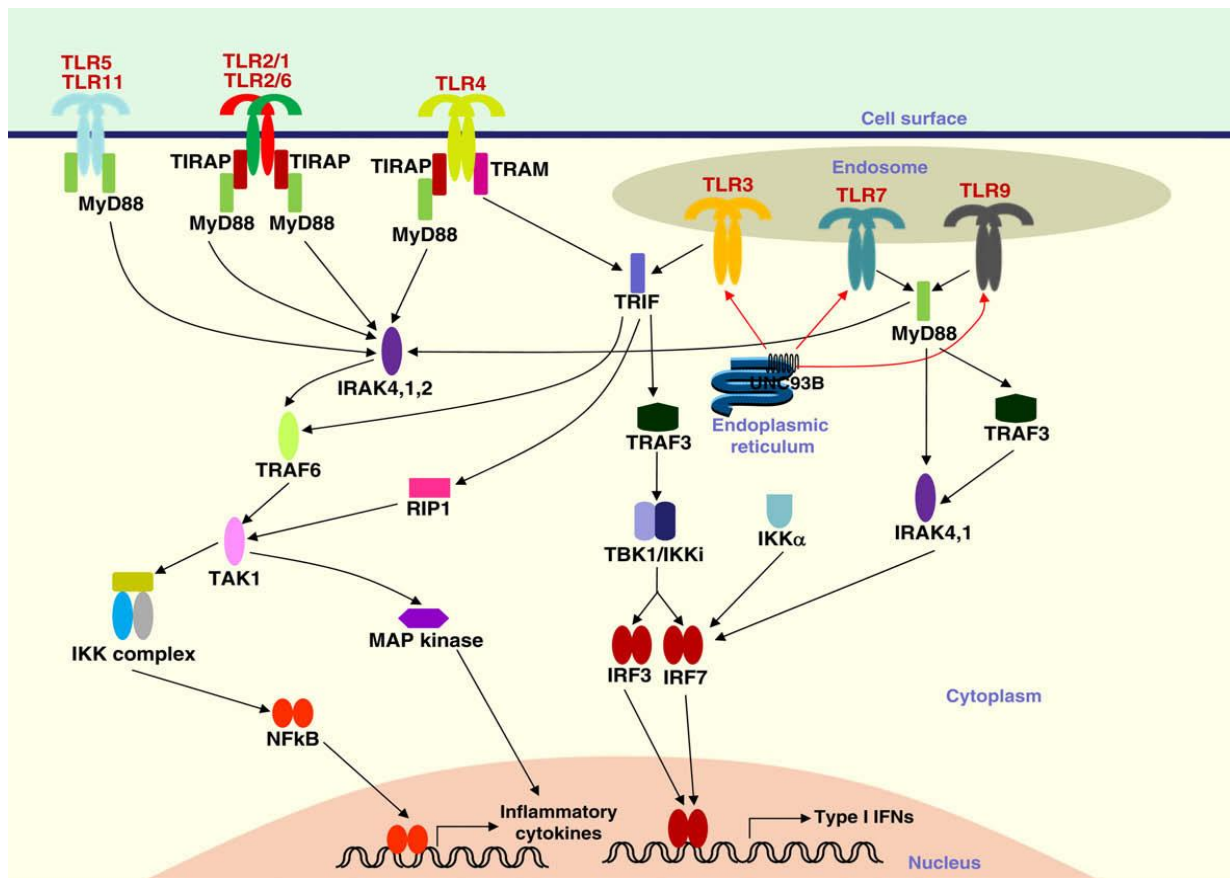


ABBILDUNG 1: TLR Signalwege in Makrophagen und Dendritischen Zellen (aus (22))

TLR 2 (in Kombination mit TLR1 oder TLR6), TLR4, TLR5 und TLR11 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert, um extrazelluläre Liganden zu erkennen. TLR3, TLR7 und TLR9 sind in den Endosomen um Liganden zu erkennen, die in deren Lumen sind. Alle TLRs außer TLR3 aktivieren MyD88, wobei TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 den zusätzlichen Adapter TIRAP

benötigen. TLR3 und TLR4 aktivieren TRIF, TLR4 benötigt dafür zusätzlich TRAM. Die Stimulation von TLR1, TLR2, TLR5, TLR6, und TLR11 führt zum MyD88 Signalweg und die vom TLR3- zum TRIF Signalweg. TLR4 aktiviert beide Wege. MyD88 aktiviert die IRAK und TRAF6 Proteinfamilien. Dies führt weiter zur Aktivierung von TAK1, IKK und am Ende von NFκB. TAK1 aktiviert außerdem die MAP Kinase. Der TRIF-Zellweg führt über die Aktivierung von RIP1 und TRAF6, TAK1 letztendlich auch zum NFκB und zu der MAP Kinase. TRIF interagiert außerdem mit TRAF3 um über TBK1/IKKi IRF3 und IRF7 zu aktivieren. NFκB und MAPK induzieren die Transkription von Genen für pro-inflammatorische Zytokine und IRFs induzieren Interferone Typ I.

1.1.5 RIG-like Helicasen

Die RIG-like Helicasen (RLHs) sind eine weniger ausführlich erforschte Familie von PRRs, die aus löslichen, nicht membrangebundenen Proteinen besteht. Mitglieder dieser Familie sind drei RNA Helicasen: RIG1, MDA5 und LGP2. Sie dienen als zytoplasmatische Sensoren für doppelsträngige RNA und sind für die antivirale Abwehr zuständig. Sie aktivieren die Transkriptionsfaktoren NFκB und IRF3/7 und induzieren die Transkription von Interferonen Typ I (24),(25),(26). An dem Signalweg ist ein neulich identifiziertes Adapter-Protein namens Cardiff beteiligt, das interessanterweise an der Mitochondrienmembran gebunden ist (27). Das stellt eine Verbindung zwischen der angeborenen Immunität und einem Organell mit prokariotischer Abstammung (von aeroben Bakterien) dar (28). Da die Mitochondrien einerseits eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielen und andererseits das Abschalten von Cardiff zu vermehrter Apoptose führt, schützt dieser Zellweg wahrscheinlich die vom Virus befallenen Zellen vor dem programmierten Zelltod (29).

1.1.6 NOD-like Rezeptoren

Die Erforschung der Toll-like Rezeptoren und speziell derjenigen von TLR-knockout Mäusen hat zu der Erkenntnis geführt, dass es in den Zellen andere zusätzliche PRRs geben muss. Auf diese Weise wurde die Familie der NOD-like Rezeptoren (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptor) entdeckt, von der beim Menschen aktuell 22 Mitglieder bekannt sind.

Das Wissen über diese Proteine hat in den letzten Jahren beträchtlich zugenommen, was zum besseren Verständnis des angeborenen Immunsystems stark beitrug. Man hat festgestellt, dass sie u.a. Rezeptor- und Gerüstproteine in großen zytoplasmatischen Komplexen, genannt Inflammasome und NOD-Signalosome sind (30),(31). Die Inflammasome sind essenziell für die Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen und zentrales Thema dieser Dissertation.

Alle Proteine, die zu dieser Familie gehören, besitzen mindestens zwei gemeinsame Merkmale: C-terminale Leucin-reiche Wiederholungen (eng. leucine rich repeats, LRRs) und zentrale domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP-1 (NACHT) Nukleotid-bindende Domänen (eng. nucleotide-binding domain, NBD). Sie unterscheiden sich jedoch in der N-terminalen Effektor-domäne. Die LRR Domäne ist für die Erkennung und Bindung von PAMPs und für die Autoregulation des Proteins verantwortlich. Dabei übt sie eine autoinhibitorische Wirkung auf die NACHT Domäne so lange aus, bis ein Ligand an sie bindet und eine Konformationsänderung auslöst (32),(33). Es werden immer mehr PAMPs identifiziert, die die NLRs aktivieren. Aktuell sind ca. 20 bekannt. Dazu zählen inerte Stoffe wie Quarz und Asbest, erhöhte intrazelluläre K^+ -Konzentration, bakterielle Toxine, β -Amyloid u.v.a. (34)-(36). Ob es sich dabei um eine direkte Interaktion zwischen Ligand und LRR handelt oder second messengers daran beteiligt sind, ist umstritten (41). LRRs mit ähnlicher Struktur gibt es auch bei den Toll-like Rezeptoren, bei denen sie ihre Liganden teilweise direkt binden (42). Solche Interaktion konnten aber bei den NOD-like Rezeptoren bisher nicht nachgewiesen werden. Die NACHT Domäne gehört zusammen mit NB-ARC und einigen weiteren Mitgliedern zu der Familie der STAND NTPasen. Sie vermittelt die Oligomerisation der NLRs, was eine Voraussetzung für ihre Aktivierung ist. Die N-terminale Domäne bestimmt die weitere Transduktion des Signals in der Zelle. Sie wird als Merkmal genutzt, um die Proteine in Subfamilien zu unterteilen (43). Die Mehrheit der NLRs besitzt eine Pyrid- Domäne (PYD) und wird deswegen NLRP oder NALP genannt

(Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich repeat and Pyrin domain containing). Die Gruppe der NODs hat eine Caspase rekrutierende Domäne (CARD). Die letzte Subfamilie besteht aus IPAFs und NAIPs. Die IPAFs haben auch CARD und die NAIPS- drei BIRs (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain) (44).

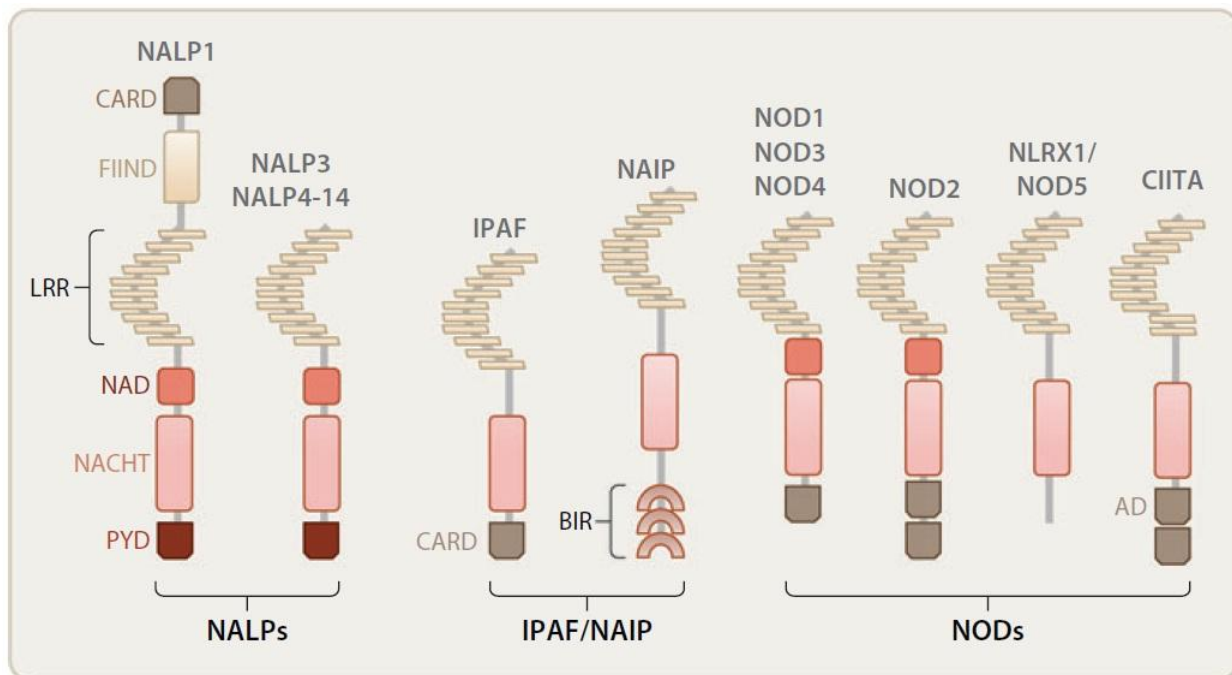


ABBILDUNG 2: Strukturelle Organisation ausgewählter NOD-like Rezeptoren (modifiziert aus (44))

Die NLRs besitzen drei strukturelle Domänen: die Ligand- bindende LRR, die Oligomerisation-vermittelnde NACHT und die Effektor - PYD, CARD oder BIR- Domäne. Die meisten besitzen eine zusätzliche, NACHT- assoziierte Domäne (NAD). Sie werden in drei Familien unterteilt: die 14 NALPs, die fünf NODs (und CIITA) und die restlichen IPAFs und NAIPs

1.1.7 NOD Signalosome

Beim Binden von Liganden, rekrutieren die Proteine NOD1 und NOD2 die RIP2 Kinase und oligomerisieren mit deren Hilfe. Die so gebildeten Komplexe werden NOD Signalosome genannt und sie aktivieren den Transkriptionsfaktor NFκB (45). NOD1 bindet Meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP), Bestandteil gramnegativer Bakterien, und NOD2 bindet Muramyl Dipeptide, die sowohl bei

gramnegativen, als auch bei grampositiven Bakterien zu finden sind. Die NOD Signalosome spielen eine sehr wichtige Rolle in Epithelzellen, wie z.B. im Magen-Darm Trakt, wo der Kontakt zu Bakterien am intensivsten ist. Mutationen von NOD2 sind mit der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert. Dabei ist die Fähigkeit des Proteins beeinträchtigt, bakterielle Komponenten zu binden, was in einer pathologischen Intoleranz gegenüber harmlosen Bakterien resultiert.

1.1.8 Die Inflammasome

Einige Mitglieder der NALP- Subfamilie bilden große zytoplasmatische Komplexe, die bei Aktivierung zur Ausschüttung von Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 18 (IL-18) führen. Dazu sind NALP1, NALP3, NALP4 und AIM2 in der Lage (46). NALP1 bindet Muramyl Dipeptide und interagiert dabei mit NOD2. NALP3 wird (als einzige Ausnahme) von mehreren Liganden aktiviert, die sehr unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften haben. Dazu gehören Komponenten von Bakterien, Viren und Pilzen, Toxine, Kristallen, ATP usw. NALP4 erkennt zytosolisches Flagellin und AIM2- doppelsträngige zytosolische DNA. Die vier Rezeptoren rekrutieren das Adapterprotein apoptosis-associated speck like protein (ASC) und aktivieren mit dessen Hilfe die Caspase 1. In Analogie zu den Komplexen, die die Apoptose regulieren, den Apoptosomen, werden diese Komplexe Inflammasome genannt. Im Unterschied zu den anderen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die bei Aktivierung bestimmte Transkriptionsfaktoren regulieren, üben Inflammasome ihre Wirkung teilweise auf Proteinebene aus. Die Caspase 1, eine Cystein-Protease, liegt im Zytosol in einer inaktiven Form als pro-Caspase vor. Bei der Formation vom Inflammasom werden zwei oder mehrere Moleküle pro-Caspase 1 zusammengebracht, die sich dann autokatalytisch gegenseitig aktivieren. Es werden zwei Untereinheiten, p20 und p10, freigesetzt, die zusammen das aktive Enzym bilden (47). Die aktivierte Caspase 1 spaltet eine Teilsequenz ihrer Substrate (von denen manche Vertreter der IL-1-Familie sind), was bei IL-1 β

und IL-18 eine Aktivierung und bei IL-33 eine Inaktivierung bewirkt (48)-(50). Die meisten Interleukine werden nur dann transkribiert und gebildet, wenn bestimmte intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt werden. Eine Besonderheit von IL-1 β und IL-18 ist, dass deren Regulation aus zwei Schritten besteht. Zuerst wird ein Gefahren-Signal benötigt, was zur Expression der Pro-Form der Peptide führt, damit dann ein zweites Signal das Inflammasom aktiviert und die Prozessierung und Ausschüttung der aktiven Formen bewirkt. Im Falle vom NALP3 Inflammasom wird die Expressionsrate vom Rezeptor selbst, die sonst als limitierender Faktor gering gehalten wird, durch das erste Signal gesteigert (57). Diese Mechanismen stehen im Einklang mit der oben beschriebenen Theorie der DAMPs und ermöglichen den Zellen eine sehr präzise Kontrolle der Freisetzung der beiden Interleukine. Aufgrund der wichtigen Funktionen, die sie ausüben, ist dies von großer Bedeutung. IL-1 β ist die potenteste fiebererregende Substanz (Pyrogen) des menschlichen Körpers, die eine Reihe von Faktoren induziert: TNF, NO Synthase, NO, Cyclooxygenase 2 (COX2), Prostaglandin E2, PLA2 (PLA2) und IL-1 β selbst (51). IL-18 seinerseits induziert IFN- γ und pro-inflammatorische Zytokine und aktiviert natural killer (NK) Zellen.

Die Aktivierung des Inflammasoms führt in manchen Fällen zu einer speziellen Art des Zelltodes- der sog. Pyroptose. Es handelt sich dabei um einen Prozess, der gemeinsame Charakteristiken sowohl mit der Apoptose als auch mit der Nekrose hat. Die Pyroptose verläuft schnell und die Caspase 1 spielt dabei eine Schlüsselrolle. Sie vermittelt nicht nur die DNA-Fragmentierung, sondern verhindert zusätzlich die Glykolyse durch Hemmung der Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Aldolase (52). Weiterhin aktiviert sie die Caspase 7, die die Apoptose in Gang setzt (53). Letztendlich führen diese Ereignisse zur Zelllyse und Freisetzung des Zellinhalts (54). In anderen Fällen kann die Caspase 1 jedoch zum Überleben der Zellen durch Aktivierung der Biosynthese von Lipiden verhelfen (55). Eine weitere Funktion,

die sie hat, ist die Kontrolle der Sekretion von unkonventionellen Peptiden, z.B. solche ohne Signalsequenz (wie pro-IL-1 α) (56).

1.1.9 AIM2

Neuere Studien haben das Protein AIM2 als intrazellulärer DNA-Sensor identifiziert. Das Gen von AIM2 gehört zu der Familie HIN-200 Gene (hematopoietic expression, IFN-inducible, nuclear localization and length of 200 amino acid domains), die durch Interferon- γ (IFN γ) induzierbar sind und bei Menschen und Mäusen vorkommen. Das menschliche System besteht aus 4 Genen: MNDA, IFI16, AIM2, und IFIX die alle auf Chromosom 1 lokalisiert sind (58). Alle HIN200 Proteine beinhalten, außer der namensgebenden HIN200, eine N-terminale Pyrin-Domäne. AIM2 ist das einzige Mitglied dieser Familie, das keine Kernlokalisationsdomäne besitzt und dementsprechend im Zytoplasma exprimiert wird (59). Es unterscheidet sich von den anderen Proteinen auch durch die Struktur der N-terminalen und der HIN200 Domänen und durch seine Fähigkeit, mit dem Adapter ASC zu interagieren (18). Eine Reihe von Untersuchungen mittels Zellkultur haben gezeigt, dass es nach Bindung von doppelsträngiger DNA ASC und Caspase 1 rekrutiert und die Ausbildung des Inflammasomkomplexes bewirkt (12), (59), (60). Dabei wird sowohl prokaryotische als auch eukaryotische DNA erkannt und gebunden (37). AIM2 ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und ist für die Erkennung einer Reihe von Viren und Bakterien verantwortlich, die ins Zellinnere vordringen. Dazu zählen das Vaccinia Virus, das Cytomegalievirus (CMV) und die Bakterien *Francisella tularensis* und *Listeria monocytogenes*, allesamt bedeutungsvolle Krankheitserreger (61)-(63). Es scheint weiterhin bei der Regulation der Zellteilung und -differenzierung beteiligt zu sein. Eine Überexpression von AIM2 führt zur verlangsamten Proliferation und erhöhter Anfälligkeit für Zelltod, wie man an Maus- Fibroblasten demonstrieren konnte

(64). Eine ähnliche Wirkung ist bei humanen Mammakarzinom-Zellen und einem Brustkrebsmodell bei Mäusen zu sehen (65). Darüber hinaus resultiert die Ausschaltung von HIN-200 Genen in der Immortalisierung von Zellen (66). Bei der Analyse von präneoplastischen Läsionen von Colon und Endometrium wurden oft Mutationen im Exon 6 von AIM2 identifiziert (67). Alle diese Daten sprechen für eine Rolle von AIM2 in der Karzinogenese.

AIM2 unterscheidet sich von den anderen Inflammasomen dadurch, dass sein Ligand präzise definiert wurde und eine direkte Ligandbindung nachgewiesen wurde (12). Außerdem ist es das erste beschriebene Inflammasom, das nicht zu der NLR-Familie gehört. Es besitzt keine NACHT-Domäne, die für die Polymerisierung der anderen Inflammasome und die Rekrutierung von ASC essentiell ist. Möglicherweise polymerisiert AIM2 direkt an die dsDNA, die es bindet. Dafür spricht auch die Tatsache, dass erst DNA Moleküle, die eine bestimmte Länge überschreiten (44 Basenpaare), in der Lage sind, AIM2 zu aktivieren (68).

In dieser Arbeit wird die Funktion von AIM2 in Zusammenhang mit der Immunantwort von menschlicher Haut bzw. Hautzellen auf Bienengift (engl. bee venom, BV) genauer erforscht.

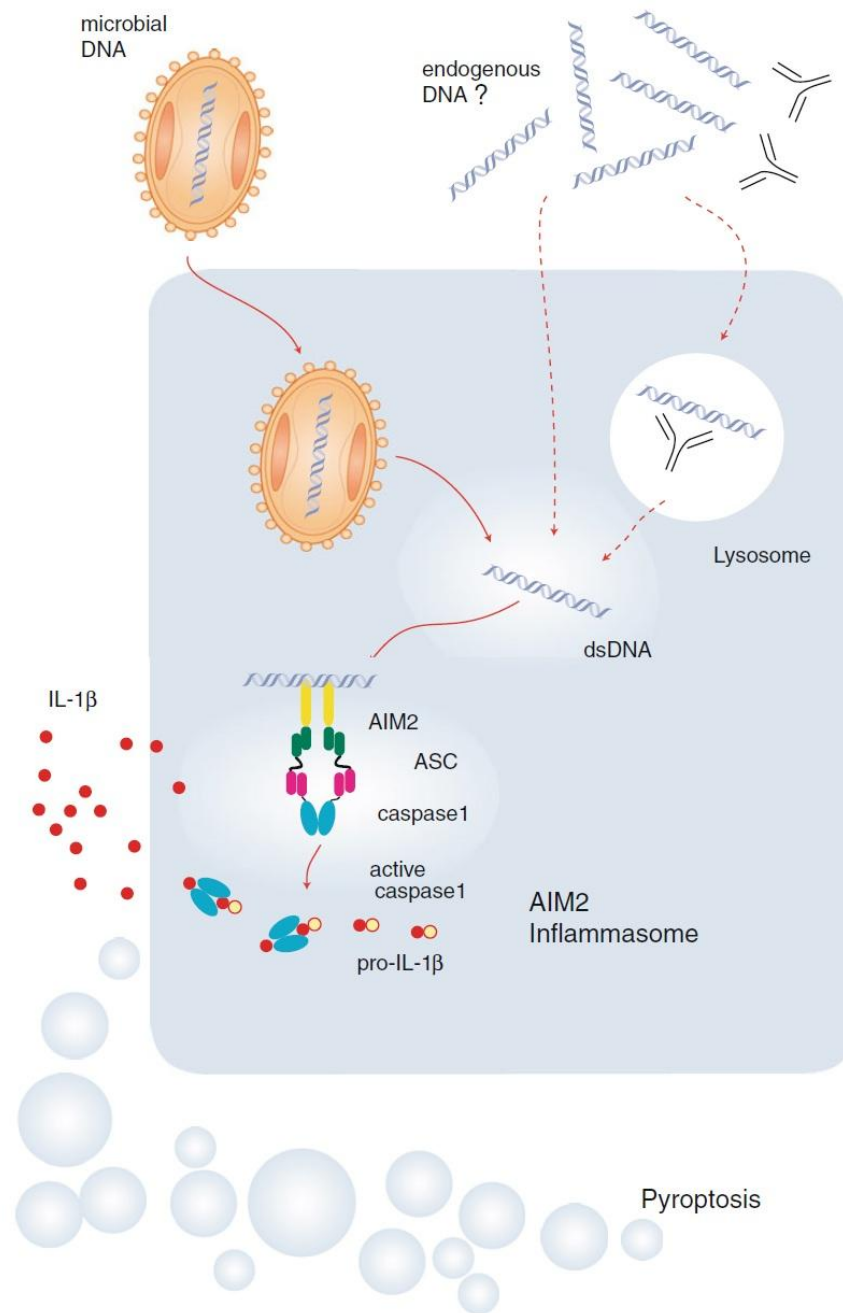


ABBILDUNG 3: Das AIM2 Inflammasom (modifiziert aus (69))

AIM2 ist ein Rezeptor, der direkt an doppelsträngiger DNA bindet. Nach Bindung eines Liganden an AIM2 wird das Adaptorprotein ASC rekrutiert und nachfolgend die Caspase 1 aktiviert. Nachgewiesene extrazelluläre Aktivatoren von AIM2 sind verschiedene Viren und Bakterien (Vaccinavirus, Cytomegalievirus; *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* u.a.).

Außerdem ist es wahrscheinlich, dass AIM2 von intrazellulärer DNA aktiviert werden kann- ein Phänomen, der möglicherweise bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen auftritt (69).

1.2 Bienengift

Das Gift der westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*), auch Apitoxin genannt, ist eine bittere farblose Flüssigkeit. Sie enthält eine komplexe Mischung verschiedener Peptide und Proteine (86). Bei einem Stich injiziert die Biene ca. 0,1 mg Gift. Das verursacht beim Menschen eine lokale Entzündung, Schwellung und starke Schmerzen, ist aber im Regelfall ungefährlich. Ausnahmen sind Stiche im Bereich des Halses und des Rachens, die zu einer Erstickung führen können. Bei Allergikern kann im schlimmsten Fall schon eine geringe Menge Gift zu einem anaphylaktischen Schock führen.

Das Bienengift hat vielseitige, teilweise sich widersprechende Wirkungen. Die lokale schmerzhaft Entzündung wird durch den gewebsschädigenden Einfluss des Giftes hervorgerufen. In vitro konnte man sowohl mit normalen, als auch mit leukämischen menschlichen Lymphozyten zeigen, dass es in einem gewissen Maß zytotoxisch ist. Die Zellproliferation wird gehemmt, die Membrane teilweise perforiert und die DNA fragmentiert (70). Bei längerer Verwendung von geringen Dosen wird jedoch ein systemischer antiinflammatorischer und analgetischer Effekt beschrieben (71). Deswegen wird Apitoxin hauptsächlich in ostasiatischen Ländern traditionell als Therapeutikum gegen rheumatische Erkrankungen eingesetzt (72). Es werden verschiedene Mechanismen angeboten, die diese Wirkung zu erklären versuchen. Einerseits kommt es in Mäusen mit induzierter Entzündung zu einer vermehrten Katecholamin- Ausschüttung in der Nebenniere (73). Andererseits berichtet Moon von einer Inhibierung der NFκB, c-Jun N-terminal kinase (JNK) und Akt Signalwege in Mikroglia, die mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert wurden (74). Letzteres wird jedoch von Stuhlmeier bestritten (75). Ein weiterer Effekt, der bei der Verwendung von Bienengift beobachtet wurde, ist die Linderung von Schmerzen. Kwon et. al. haben demonstriert, dass

die Injektion von Apitoxin in Akupunkten die arthritischen Schmerzen von Ratten lindern kann (72). Dafür wurden Vorgänge verantwortlich gemacht, die sich im ZNS abspielen: eine verminderte Expression von Fos und erhöhte Aktivierung von $\alpha 2$ Adrenozeptoren im Rückenmark (76),(77). Es ist aber fraglich, ob diese Wirkungen dem Gift oder der Akupunktur selbst zuzuschreiben sind.

Hauptbestandteil des Bienengiftes (ca. 52%) ist Melittin (78). Es ist ein kationisches Peptid bestehend aus 26 Aminosäuren, das einen lipophilen N-Terminus und einen Hydrophilen C-Terminus besitzt. Es lagert sich an Zellmembranen, bildet Kanäle und erhöht auf diese Weise die Ionenpermeabilität. In höheren Konzentrationen lysiert es die Membrane vollständig. Es wirkt pro-inflammatorisch (79) und kann sowohl Vasokonstriktion als auch Vasodilatation hervorrufen (80). Melittin besitzt außerdem antimikrobielle Eigenschaften. Das wurde u.a. bei *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Borrelia burgdorferi* und *Chlamydia trachomatis* demonstriert (81)-(84). Aktuell wird die Wirksamkeit des Melittins bei der Tumorthherapie erforscht (85).

Ein weiterer Bestandteil vom Apitoxin ist das Enzym PLA₂. Es macht etwa 10-12% des Gifts aus und ist das destruktivste Komponent. Es baut in der Zellmembran gelagerte Phospholipide ab und bildet Arachidonsäure. Bei physiologischen Bedingungen wird die Arachidonsäure weiterhin von der Cyclooxygenase zu verschiedenen Prostaglandinen und von der Lipoxigenase zu Leukotrienen umgewandelt (87). In der Konzentration, in der es im Bienengift vorhanden ist, hat es hingegen eine toxische Wirkung. Die Zellmembranen werden aufgelöst und die Zellen sterben ab- ein Effekt, der am deutlichsten in der Muskulatur zu beobachten ist und unter bestimmten Bedingungen zu einer systemischen Myolyse führen kann (88). Außerdem senkt die Phospholipase den Blutdruck und hemmt die Gerinnung (89).

Apamin ist ein Peptid, das aus 18 Aminosäuren besteht und ungefähr 2% des Apitoxins ausmacht (90). Es handelt sich dabei um ein mildes Neurotoxin, das

die SK Kanäle (small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels), die sowohl im ZNS als auch in Hepatozyten, Endothelzellen und intestinalen Myozyten lokalisiert sind, selektiv blockiert. Eine Intoxikation mit Apamin kann diverse Symptome verursachen: lokale Schmerzen, Schwellung und Rötung, Opticus-Neuritis und -Atrophie, Vorhofflimmern, Guillain-Barre Syndrom, Krallenhand, erhebliche Hämorrhagie in den Lungen u.a., wobei diese Effekte nicht immer eindeutig nur auf dieses Komponent des Bienengiftes zurückzuführen sind (92)-(94).

Adolapin ist ein Polypeptid, das antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und zu ca. 2-5% im Apitoxin enthalten ist. Seine Wirkung basiert einerseits auf Inhibierung der Cyclooxygenase und dementsprechend der Synthese von Prostaglandinen und andererseits auf Vorgängen im ZNS, die jedoch noch näherer Untersuchung bedürfen (95)(96).

1-3% des Bienengiftes bildet die Hyaluronidase (auch „spreading factor“ genannt)- ein Enzym vom Typ der Endoglykosidasen, das v.a. Hyaluronsäure, aber auch Chondroitin und Chondroitinsulfat spaltet (97). Da Hyaluronsäure ein Bestandteil der extrazellulären Matrix ist, führt ihr Abbau zu einer Erhöhung der Gewebspermeabilität. Außerdem bewirkt das Enzym eine Vasodilatation. Das hat eine Ausbreitung der Entzündung zur Folge.

Das Mastzellen-degranulierende Peptid (eng. Mast Cell Degranulating Peptide, MCD) ist ein bitykisches Peptid aus 22 Aminosäuren (98). Bei niedrigen Konzentrationen bewirkt es eine starke Histamin-Ausschüttung (99). Wenn die Konzentration einen bestimmten Wert überschreitet, hemmt es hingegen die Degranulation von Mastzellen (100)(101). Das kommt wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion zwischen dem Peptid und IgE Molekülen zustande, die die Bindung der Antikörper an die Mastzell-Rezeptoren hemmt (102).

In geringeren Konzentrationen sind im Bienengift noch Minimine, Procamine A und B, Secarpin, Tertiapin, Cardiopep, Glucosidase, Saure Phosphomonoesterase, Histamin, Dopamin, Noradrenalin, Kohlenhydrate, r-Aminobutytrat, B-Aminoisobutytrat u.a. enthalten (103).

| Bestandteil | % von Trockensubstanz | |
|--|------------------------------|-------------------|
| | Laut (104) | Laut (105) |
| Phospolipase A2 | 10-12 | 10-12 |
| Hyaluronidase | 1-3 | 1.5-2.0 |
| Saure Phosphomonoesterase | | 1.0 |
| Lysophospholipase | | 1.0 |
| α -Glukosidase | | 0.6 |
| Melittin | 50 | 40-50 |
| Apamin | 1-3 | 3 |
| Mast Cell Degranulating Peptide (MCD) | 1-2 | 2.0 |
| Secapin | 0.5-2.0 | 0.5 |
| Procamin | 1-2 | 1.4 |
| Adolapin | | 1.0 |
| Protease inhibitor | | 0.8 |
| Tertiapin | 0.1 | 0.1 |
| Oligopeptide (mit weniger als 5 Aminosäuren) | 13-15 | |
| Histamin | 0.5-2.0 | 0.6-1.6 |
| Dopamin | 0.2-1.0 | 0.13-1.0 |
| Noradrenalin | 0.1-0.5 | 0.1-0.7 |
| T-Aminobutyrssäure | 0.5 | 0.4 |
| α -Aminosäuren | 1.0 | |
| Glukose and Fruktose | 2 | |
| Phospholipide | 5 | |
| Volatile Komponente | 4-8 | |

TABELLE 2: Bestandteile des Bienengifts in Vol% von der Trockensubstanz

Obwohl im Apitoxin viele toxische Substanzen enthalten sind, die in der Lage sind, Zellen zu lysieren, Gewebe zu schädigen, die Funktion von Nervenzellen zu beeinträchtigen usw., ist die von einer Biene injizierte Menge nicht ausreichend, um einen Menschen zu gefährden. Es sind Fälle bekannt, in denen Menschen von einer Vielzahl von Bienen gleichzeitig angegriffen und gestochen werden. Das kommt dadurch zustande, dass die Biene beim Stechen Botenstoffe freisetzt, die ihre Artgenossen in der Umgebung auch zum Stechen anregen. Es ist aber eine Seltenheit, dass die Angriffe so massiv sind, dass das Leben des Menschen in Gefahr gerät. Man rechnet dabei mit mehr als 20 Stichen pro kg Körpergewicht (106). In solchen Fällen treten Hämolyse, Rhabdomyolyse, Niereninsuffizienz, Leberinsuffizienz und massive Ödeme ein (107)-(110).

Außer der normalen (lokalen) und der toxischen Reaktion auf Bienengift werden noch die sog. ausgeweiteten lokalen, die seltenen und die anaphylaktischen Reaktionen beobachtet. Menschen, die eine ausgeweitete lokale Reaktion auf einen Stich hatten, tendieren im Vergleich zu denen mit einer normalen Reaktion eher dazu, anaphylaktisch auf weitere Stiche zu reagieren (111). Zu den seltenen Reaktionen gehören die Serumkrankheit mit Urtikaria, Arthralgie, Fieber und Unwohlsein für ca. 7 Tage nach dem Stich, die neurologische, nephritische, vaskulitische, und enzephalitische Reaktionen, die innerhalb von zwei Wochen nach dem Stich auftreten können (112)-(113).

Die anaphylaktischen Reaktionen nach Hymenoptera-Stichen sind lebensgefährlich und treten viel häufiger auf als die toxischen. Die Prävalenz wird in verschiedenen Studien zwischen 0,3% und 7,5% für Europa (114) und zwischen 0,5% und 3,3% für Amerika (115) angegeben. Die Mortalität wird zwischen 0,03 und 0,48 pro 1.000.000 Bewohner pro Jahr angegeben (114), wobei die großen Unterschiede wahrscheinlich auf die schwankende Effektivität zurückzuführen sind, mit der die Fälle korrekt erkannt und gemeldet werden (116).

In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um Typ 1 Sofortreaktionen nach Coombs und Gell (117). Die Betroffenen bilden IgE Antikörper gegen Epitope von verschiedenen Proteinen im Bienengift. Die länger bekannten Hauptallergene sind PLA₂, Hyaluronidase und Melittin, das allerdings schwächer als die ersten beiden ist (118)-(120). Mit Verbesserung der Methoden inkl. genomischer Analyse wurde eine Reihe weiterer Komponenten identifiziert, die auch in der Lage sind, allergische Reaktionen zu verursachen. Dazu zählen Saure Phosphatase, Dipeptidylpeptidase IV, Carboxylesterase, Icarapin, PVF-1, MRJP9, Hexamerin-2, MRJP8 (121)-(123). Die einzige wirksame Prävention von schweren allergischen Reaktionen auf Hymenoptera Gifte ist die Immuntherapie. Dabei handelt es sich um eine Desensibilisierung, bei der klassischerweise das jeweilige Gift nach einem bestimmten Schema (Protokoll) injiziert wird, gegen das der Patient allergisch reagiert (124). Man kann damit eine Reduktion des Risikos für eine anaphylaktische Reaktion von ursprünglich höher als 50% auf weniger als 5% erzielen (125). Um die Wirksamkeit dieser Behandlung zu erhöhen und die Nebenwirkungen zu minimieren, gibt es in den letzten Jahren mehrere Versuche, bestimmte Allergene von dem Gift rekombinant zu synthetisieren und für die Hyposensibilisierung zu verwenden (126).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Es gibt immer mehr Daten über die Rolle der Inflammasome bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Reaktionen des Körpers auf die Umwelt. Es wurde gezeigt, dass NALP3 Mutationen mit Autoimmunerkrankungen wie Urtikaria und Cryopyrin-Associated Periodic Syndrom (CAPS) assoziiert sind (127), (128). Bei diesen Patienten werden erhöhte Konzentrationen von aktivem IL-1 β gemessen, was einen Teil der Symptome erklärt und zugleich einen guten Ansatz für die Therapie darstellt (129). Interessanterweise wird ein Großteil davon von den Mastzellen freigesetzt (130). Außerdem hat das Inflammasom

eine Bedeutung bei der Entwicklung von allergischen Erkrankungen wie dem Kontaktekzem (131). In diesem Fall stellt es eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem spezifischen Immunsystem her, indem es die T-Zell Antwort induziert (132). Weiterhin hat das Inflammasom eine direkte Verbindung mit dem Zelltod. Einerseits wird NALP3 bei der Nekrose aktiviert (133),(134) und andererseits kann die Aktivierung von NALP3 zu einer speziellen Form von Zelltod, der Pyroptose, führen (135),(136).

Das Bienengift kann bekannterweise eine lokale Gewebsschädigung verursachen, bei der auf Zellebene Nekrose zu beobachten ist. Außerdem führt es bei einer Vielzahl von Menschen zu allergischen Reaktionen, die lebensgefährlich sein können. Um einen besseren Einblick in die Mechanismen zu gewinnen, die hinter den verschiedenen Wirkungen des Giftes auf den Menschen stehen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Beteiligung der Inflammasome an der nicht-allergischen Immunreaktion untersucht, die durch Apitoxin verursacht wird. Da Bienengift in die Epidermis injiziert wird, sind die Haut und ihre zellulären Bestandteile primärer Angriffspunkt eines Bienenstichs und initiieren und beeinflussen als erstes die nachfolgende Immunreaktion. Um dem natürlichen Ablauf am nächsten zu kommen, wurden die Experimente mit Keratinozyten und Hautstanzen durchgeführt. Ziel war festzustellen, inwieweit und welche Inflammasome bei der Entstehung der beobachteten nicht-allergischen Immunreaktionen in der Haut beteiligt sind. Ferner sollte untersucht werden, welche Komponenten des Giftes dabei eine Rolle spielen, und wie sie die Immunreaktion in der Haut beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Zellkulturexperimente

Die Zellkulturexperimente wurden bei sterilen Bedingungen unter einer Werkbank (Herasafe, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die benötigten Reagenzien wurden bei 4°C gelagert und bei Raumtemperatur benutzt. Es wurden humane Keratinozyten (Human Epidermal Keratinocytes, Neonatal von Invitrogen, NHEK) verwendet. Die Zellen wurden in EpiLife Medium mit 1xEpiLife Defined Growth Supplement (EDGS, Cascade Biologics) kultiviert, dem 10µg/ml Gentamycin und 0,25µg/ml Amphotericin B zugesetzt wurden. Sie wurden in 75 cm² Flaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Flaschen wurden mit Coating Matrix, verdünnt 1:100 in Dilution Medium (beide von Cascade Biologics), 30 Minuten vorbehandelt. Beim Erreichen einer Konfluenz von über 90% wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA (0,025% Recombinant Trypsin, 0,01% EDTA, Cascade Biologics) bei 37°C für 4-6 Minuten von den Flaschen abgelöst, danach in 2ml Trypsin-Neutralizer (0,5% Newborn Bovine Serum, Cascade Biologics) und 8ml EpiLife Medium aufgenommen und bei 900 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10ml frischem EpiLife resuspendiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in 6- oder 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät, die auch mit Coating Matrix für 30 Minuten vorbehandelt wurden, und bei 37°C weiter inkubiert, bis die gewünschte Zelldichte erreicht wurde. Die restliche Zellsuspension wurde in eine neue 75 cm² Flasche übertragen und inkubiert bis zur Konfluenz. Die Zellen wurden auf diese Weise bis zur Passage 5 für Experimente verwendet.

2.1.2 Behandlung mit Bienengift

Das lyophilisierte Reless Bienengift von ALK Abello wurde in 120 µl Wasser aufgelöst, um eine Konzentration von 1 mg/ml zu erreichen. Diese Stock-Lösung wurde bei -20°C gelagert und bei der Behandlung von Zellen mit EpiLife Medium weiterhin auf die gewünschten Konzentrationen von 1, 2,5, 5, und 10 µg/ml verdünnt. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 10 ng/ml TNFα (Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α, Biomol) vorbehandelt und zwei bis 24 Stunden mit dem verdünnten Bienengift inkubiert.

2.1.3 Behandlung mit Bienengift-Bestandteile

Außer mit natürlichem Bienengift wurden Versuche mit den folgenden Bestandteilen durchgeführt: Melittin, Stock 5 mg/ml; Apamin, Stock 1 mg/ml, PLA2, Stock 2 mg/ml (von Sigma Aldrich, alle in dH2O gelöst). Die Stock-Lösungen wurden mit EpiLife verdünnt: Melittin auf 5 µg/ml, Apamin auf 1 µg/ml und PLA2 auf 1 µg/ml. Die Zellen wurden analog zu der Behandlung mit ganzem Bienengift mit TNFα voraktiviert und danach mit den Bestandteilen für zwei bis 24 Stunden inkubiert.

2.1.4 Analyse der Zellsignalwege

Um feststellen zu können, welche Inflammasome bei der Behandlung mit Bienengift aktiviert werden, wurde die Translation bestimmter Inflammasomkomponenten unterbrochen. Dazu wurden die Zellen mit siRNA transfiziert, sobald sie eine Konfluenz von 30-40% aufwiesen. Es wurden die folgenden siRNAs genutzt:

| Zielprotein | | Sequenz siRNA |
|--------------------|-----|-----------------------------------|
| Kontroll siRNA | CO3 | 5'-GCG CAU UCC AGC UUAC GUA UU-3' |
| | CO4 | 5'-GCG CUA UCC AGC UUA CGU AUU-3' |
| AIM2 | | 5'-GCU ACC UUG AUG AUU CAAA-3' |
| AIM2.2 | | 5'-GCU ACC UUG AUG AUU CAA ATT-3' |
| ASC | | 5'-CCG CCG AGG AGC UCA AGAA-3' |
| NALP3 | | 5'-CAA CAG GAG AGA CCU UUAU-3' |
| Caspase 1 | | 5'-GAA GAC UCA UUG AAC AUAU-3' |

TABELLE 3: Sequenzen der verwendeten siRNAs

Sie wurden in Optimum Reduced Serum Medium (GIBCO) auf 0,24 µg/ml verdünnt. Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen) wurde 1:100 in Optimum verdünnt und nach 5 Minuten Inkubation mit den siRNA Lösungen in Verhältnis 1:1 zusammengeführt und 20 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit den so gefertigten Transfektionslösungen (1:5 in EpiLife Medium verdünnt) für 48 Stunden inkubiert. Weiterhin wurden NHEK Zellen mit der Kombination von Bienengift (2,5 µg/ml) und DNase (2 U pro 100 µl Medium; DNase I, RNase-free von Fermentas) oder mit Bienengift oder mit DNase allein als Kontrolle für 6 Stunden inkubiert. Um sicherzustellen, dass das Enzym bei den Versuchsbedingungen funktioniert hat, wurden zusätzliche Proben angesetzt: Genomische DNA wurde in EpiLife Medium gelöst und in zwei Reaktionsgefäße verteilt. Zu dem einen wurde DNase (2 U/100 µl) zugegeben. Zusätzlich wurde die gleiche DNA in derselben Konzentration in Reaktionspuffer gelöst (Reaction Buffer $MgCl_2$, Fermentas) und auch mit DNase behandelt. Die drei Proben wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert und durch Gelelektrophorese ausgewertet (s.u.).

2.1.5 Ex-Vivo Experimente mit Hautstanzen

Proben gesunder Haut von Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München wurden bei chirurgischen Eingriffen gewonnen, die aus sonstigen Gründen durchgeführt wurden. Schriftliche Einverständnisse

der Patienten lagen vor und das Experiment wurde von der Ethikkommission der LMU München genehmigt. Das Material wurde innerhalb von einer Stunde nach der Entnahme weiterverarbeitet. Die Haut wurde mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4, autoklaviert) gewaschen, in Ethanol (Sigma-Aldrich) desinfiziert und erneut mit PBS abgespült, um die Alkoholreste zu entfernen. Das Fettgewebe wurde mit einem Skalpell entfernt und es wurden Stanzen mit einem Durchmesser von 5 mm gemacht. Die Stanzen wurden in 600 µl EpiLife Medium in 24-Well-Schalen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von Bienengift vorbereitet: 1 mg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml. In die Hautstanzen wurde je 100 µl von den Giftzubereitungen oder 100 µl Wasser injiziert. Als Kontrolle wurde eine Hautstanze unbehandelt gelassen. Dann wurden die Proben in neues Medium eingelegt und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Überstand aufgenommen, bei 2000 rpm für drei Minuten zentrifugiert, in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde die Konzentration von dem freigesetzten IL-1β mittels ELISA bestimmt. Außerdem wurden die Hautstanzen histologisch aufgearbeitet und unter dem Mikroskop analysiert.

2.1.6 HE Färbung

Von den Hautstanzen wurden in der Histologie Schnitte gefertigt. Es folgte eine Anfärbung in Hämatoxylin (nach Mayer) für 4 Minuten, dreifaches Bläuen für jeweils 3 Minuten in Leitungswasser, 3 Minuten Spülung in H₂O und Anfärbung mit Eosin (Sigma) für 3 Minuten. Danach wurden die Schnitte erneut dreifach in Leitungswasser jeweils 3 Minuten lang gebläut, 3 Minuten mit H₂O gespült und in Mowiol oder Gelatine eingedeckelt.

2.2 Analysemethoden

2.2.1 Interleukin 1 β ELISA

Der Enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ist ein immunologisches Verfahren, mit dessen Hilfe nicht nur Proteine sondern auch niedermolekulare Verbindungen in einer Probe quantitativ nachgewiesen werden können. Er basiert auf die Eigenschaften von Antikörpern (AK), die ihre Antigene mit hoher Spezifität und Sensitivität stabil binden. Bei dem ELISA werden entsprechende „Capture“ AK auf einer Oberfläche befestigt und danach mit der zu untersuchenden Lösung in Kontakt gebracht. Befinden sich in dieser Lösung Verbindungen, deren Epitope als Antigen von den AK erkannt werden, so werden sie gebunden. Die ungebundenen Bestandteile werden beim Waschen entfernt. Danach wird ein zweiter, „Detection“ AK hinzugefügt, der ein anderes Epitop des gesuchten Stoffes bindet und außerdem mit einem Enzym versehen ist. Überschüssiges AK wird durch Abwaschen entfernt. Ein passendes Substrat wird zugegeben, das vom Enzym umgewandelt wird und seine Farbe ändert. Dabei entspricht die Farbänderung der Konzentration des gesuchten Stoffes. Um genaue Werte zu ermitteln, werden außer der zu untersuchenden Probe Lösungen mit bekannter Konzentration des gleichen Stoffes mit untersucht. Auf diese Weise können Farbwerte mit Konzentrationen in Korrelation gesetzt werden.

Die Überstände der behandelten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit aufgenommen, bei 2000 rpm drei Minuten lang zentrifugiert und in neue Reaktionsgefäße überführt. Das Material wurde bei -20°C bis zu Weiterverarbeitung gelagert. Die Messungen wurden mit dem IL-1 β ELISA Duo Set (von R&D Systems) durchgeführt. 100 μ l Capture Antibody pro Well, verdünnt in PBS auf 4 μ g/ml wurde auf eine entsprechende Anzahl von MaxiSorp Strips (NUNC) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Wells dreimal mit je 300 μ l PBS-T (PBS mit 0.05% Tween) gewaschen und mit 300 μ l Reagent Diluent (PBS mit

1% BSA, sterilfiltriert) pro Well zur Absättigung der unspezifischen Bindungen auf der Platte behandelt. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut wie oben beschrieben gewaschen und je 100 µl von den Proben, sowie von den Standards (vorverdünnt in Reagent Diluent, 7 Konzentrationen von 200 bis 3,125 pg/ml und zusätzlich Nullwert aus Reagent Diluent) wurden aufgetragen. Nach zwei Stunden wurde wieder gewaschen und 100 µl Detektions-Antikörper (verdünnt auf 300 ng/ml in Reagent Diluent) wurden pro Well gegeben. Nach einer weiteren zweistündigen Inkubation wurde drei Mal gewaschen, 100 µl Streptavidin-HRP (verdünnt 1:200 in Reagent Diluent) pro Well wurden aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Die TMB-Lösung (42mM TMB in DMSO, 1:100 in 0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 5,2) wurde mit H_2O_2 im Verhältnis von 5000:1 aktiviert. 100 µl wurden pro Well zugegeben und je nach Reaktionsstärke 15 bis 25 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Schwefelsäure pro Well gestoppt. Es wurde innerhalb von 20 Minuten am Photometer mit der Wellenlänge 450 nm und der Wellenlängenkorrektur 540 nm gemessen.

2.2.2 RNA Extraktion

Die RNA der Zellen wurde nach der Behandlung mittels Trizol Reagent (Invitrogen) extrahiert. Dazu wurde der Zellüberstand entfernt, 1ml Trizol pro Well in einer 12-Well Schale mit Zellen gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde in entsprechend gekennzeichnete Reaktionsgefäße überführt. Es wurde 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) pro Gefäß zugegeben und kräftig geschüttelt. Nach drei Minuten Einwirkzeit wurden die Gefäße bei 12000 rpm und 4°C 15 Minuten lang zentrifugiert, wobei es zur folgenden Phasentrennung kam:

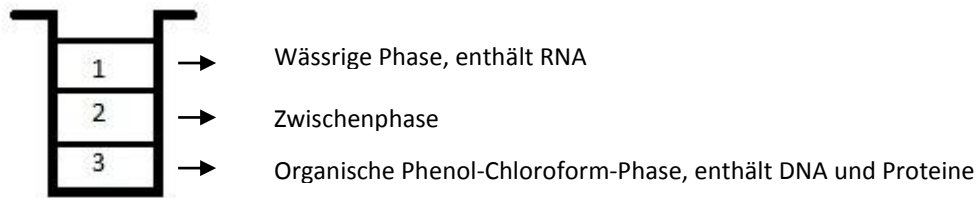


ABBILDUNG 4: Schematische Darstellung eines Reaktionsgefäßes nach der Zentrifugation

400 μ l von der oberen, farblosen, wässrigen Phase wurden vorsichtig abpipettiert und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Zugabe von 0,5ml Isopropanol (Sigma-Aldrich) hat zu der erwünschten RNA-Präzipitation geführt- dafür wurde die Lösung gevortext und 10 Minuten lang inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Der Isopropanol-Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde mit 1ml 75% Ethanol (Merck) gewaschen, gevortext und erneut bei 7500rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgegossen und die RNA- enthaltenden Gefäße wurden an der Luft ca. 20 Minuten lang getrocknet. Das RNA-Pallet wurde in 20 μ l DEPC-H₂O gelöst und bei -80°C gelagert.

2.2.3 cDNA Synthese

Um von den RNA-Proben cDNA zu synthetisieren wurde der DyNAmo cDNA Synthesis Kit (von Finnzymes) verwendet. Es wurde ein Mastermix vorbereitet, der pro Probe 10 μ l 2x RT-Puffer, 1 μ l Primer Random Hexamer und 2 μ l Transkriptase enthielt. In 0,2ml Reaktionsgefäße wurden jeweils 13 μ l Mastermix und 7 μ l RNA-Lösung gemischt, gevortext und kurz herunterzentrifugiert. Die Synthese erfolgte im Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), wobei die Proben 30min bei 37°C erwärmt, anschließend 5

Minuten auf 85°C erhitzt und am Ende auf 4°C abgekühlt wurden. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 Semi-quantitative Real Time PCR (RT-PCR)

Durch RT-PCR wurden Expressionsunterschiede bestimmter Gene gemessen, wobei immer gleichzeitig ein Ziel- und ein Referenzgen (Porphobilinogendeaminase, PBGD) bestimmt wurden. Es wurde ein Mastermix, bestehend pro Probe aus 0,1 µl Probe PBGD, 0,1 µl Primer PBGD, 0,1 µl Probe Zielgen, 0,2 µl Primer links Zielgen, 0,2 µl Primer rechts Zielgen, 2 µl LightCycler TaqMan Mastermix und 4,3 µl H₂O (alle von Roche) zubereitet. In entsprechende Capillar-Gefäße wurden 7 µl Mastermix und 3 µl cDNA Probe pipettiert und die Gefäße wurden anschließend bei 1000 rpm und 4°C 30 sec. lang zentrifugiert. Die Untersuchung erfolgte im Light Cycler System von Roche, wobei das folgende Protokoll verwendet wurde:

| Schritt | Temperatur | Dauer | Anmerkungen |
|---------|------------|---------|--------------------------------------|
| 1 | 95°C | 10 min. | Preinkubation |
| 2 | 95°C | 10 sec. | Denaturierung |
| 3 | 60°C | 30 sec. | Annealing |
| 4 | 72°C | 1 sec. | Elongation ->Schritt 2, 65 Zyklen |
| 5 | 40°C | 30 sec. | Kühlung |

TABELLE 4: qRT-PCR Protokoll für die Messung der Genexpression im LightCycler

2.2.5 Gelelektrophorese

Für die Gelvorbereitung wurde 1,5 g peqGOLD Universal Agarose (peqLAB) zu 150ml TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA Puffer: 40 mM Tris (ICN), 1 mM EDTA (ICN) 20 mM Eisessig (Merck)) zugegeben und aufgekocht. Es wurde 6 µl RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (Intron Biotechnology) zugegeben und die Mischung wurde in einer Elektrophoresekammer (PEQLab Biotechnologie) mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Abkühlen des Gels wurde die Kammer

mit TAE Puffer gefüllt und der Kamm entfernt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Loading Dye (1:6, Qiagen) gemischt und auf das Gel geladen. Zusätzlich wurde 15 µl MassRuler DNA Ladder Mix mit 10 µl H₂O verdünnt und auch auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V 45 Minuten lang durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter UV Licht in der BioDoc Analyze UV Kammer (Biometra) und das Gel wurde fotografiert.

2.2.6 Western Blot

2.2.6.1 Proteinisolierung aus Überstand von NHEK Zellkultur

Der Überstand der Zellen wurde nach Ablauf des Experiments in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße aufgenommen. Um die Proteine zu fällen, wurde 100% Trichloressigsäure im Verhältnis 1:10 zugegeben. Die Proben wurden 60 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 rpm und 4°C 15 Minuten lang zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und das Pellet mit 1,5ml Aceton gewaschen. Die Gefäße wurden gevortext und erneut bei 13000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Aceton wurde abgossen und das Pellet wurde in 35 µl RIPA-Puffer (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1% Triton x-100, 0,1% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 140 mM NaCl + 1 mM PMSF-kurz vor der Verwendung zugegeben) resuspendiert. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 Proteinisolierung aus NHEK Zelllysate

Die Zellen, deren Überstand vorher abgenommen worden war, wurden mit PBS gewaschen und in 100 µl RIPA-Puffer mithilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Zellen lysiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 3 Minuten. Die Proteine befanden sich im Überstand, wohingegen Organellen und Zellmembranen pelletiert wurden. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße pipettiert und bei -20°C gelagert.

2.2.6.3 Proteinkonzentrationsmessung

Die Proteinkonzentrationen der Überstände und der Lysate wurden mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt. Dazu wurden in eine 96-Well-Schale je 5 µl der Proben und der Standards (BCA Kit) in den folgenden Konzentrationen vorgelegt: 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/ml. Anschließend wurden 200 µl Proteinbestimmungspuffer (BCA Protein Assay, Reagent A.: Reagent B 50:1) pro Well zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung wurde am Photometer bei 562 nm durchgeführt und die Proteinkonzentrationen anhand der Standardkurve ermittelt.

2.2.6.4 Elektrophorese

Das Gel (NuPAGE Novex Bis-Tris-Mini-Gel 10% von Invitrogen) wurde in die Kammer (XCell Sure Lock Electrophoresis Cell von Invitrogen) gestellt und diese wurde mit NuPAGE Loading Buffer (Invitrogen) gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen gespült. Anhand der vorher gemessenen Proteinkonzentration wurde die Probenmenge berechnet, die für die homogene Gelbeladung nötig war. Dabei wurde die Probe mit der geringsten Konzentration unverdünnt verwendet und die restlichen wurden bis zum gleichen Wert mit Wasser verdünnt. Die entsprechenden Mengen der Proben und Wasser (Endvolumen 20 µl) wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und 7,5 µl NuPAGE SDS Sample Buffer und 3 µl NuPAGE Sample Reducing Agent (beide von Invitrogen) wurde zugegeben. Die so gefertigten Mischungen wurden gevortext, zentrifugiert und bei 70°C 10 Minuten lang auf dem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Danach wurden sie erneut gevortext und herunterzentrifugiert und vorsichtig auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150V für 50-70 Minuten.

2.2.6.5 Blotting

Die Invitrolon PVDF Membran wurde für ca. 10 sec. in Methanol gelegt, danach mit Wasser gespült und in NuPAGE Transferpuffer (20x Transferpuffer, 15% Methanol, Wasser) für 15 Minuten äquilibriert. Das Gel wurde aus der Kammer

entnommen, von der Plastikhülle befreit und ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Sechs Watte pads wurden mit Transferpuffer getränkt und die Blotkammer wurde folgendermaßen zusammengesetzt: auf dem Minus Pol wurden drei Watte pads gelegt, auf die das Gel kam. Darauf wurde die Membran zwischen zwei Blättern Filterpapier gelegt und zu dem Pluspol hin wurden die restlichen drei Watte pads hinzugefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten eingeschlossen blieben. Die Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und bei 24 V für 90 Minuten unter Spannung gelegt.

2.2.6.6 Ponceau Färbung

Als Nachweis des erfolgreichen Blottens und um die Verteilung der Proteine auf der Membran abschätzen zu können, wurde sie für 2 Minuten in Ponceau Lösung (0,1% Ponceau S, Sigma), 5% Essigsäure, Merck) gelegt, danach dreifach mit Wasser gewaschen und fotografiert.

2.2.6.7 Nachweis des gesuchten Proteins

Zuerst wurden die unspezifischen Bindungen auf der Membran blockiert. Western Blocking Reagenz (Roche) wurde 1:10 in TBS (6,05 g Tris (50 mM), 8,76 g NaCl (150 mM), 800ml H₂O, 9,5ml HCL, pH 7,5) verdünnt. Die Membran wurde in die Lösung gelegt und eine Stunde lang inkubiert. Danach wurde der Antikörper (Caspase 1-p20 Rabbit von Cell Signaling oder Anti-Human-ASC monoclonal Antibody, MBL) in TBS mit 0,5% Western Blocking Reagent 1:1000 verdünnt. Die Membran wurde mit TBST (1ml Tween 20 Detergent von Calbiochem in 1 Liter TBS) gewaschen und über Nacht mit dem Antikörper bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde sie dreimal für 10 Minuten auf dem Schüttler mit TBST gewaschen. Der Zweitantikörper (HRP-konjugierter Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins von Dako) wurde in TBS mit 0,5% Western Blocking Reagent 1:5000 verdünnt. Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in dieser Lösung auf dem Schüttler inkubiert und danach erneut dreifach mit TBST gewaschen. Als Nächstes folgte die Detektion mit dem ECL-Plus Kit (Amersham). Dazu wurden 1,2ml von der

Lösung A mit 40 µl von der Lösung B gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde zwischen zwei Schichten Klarsichtfolie gelegt. Nach fünf Minuten Inkubation im Dunkeln wurde die Detektionslösung herausgedrückt. In der Dunkelkammer wurde ein Hyperfilm ECL (Amersham) auf die Membran für fünf Sekunden bis drei Stunden (je nach Signalstärke) gelegt und danach entwickelt.

2.2.6.8 Kontrolle der Beladung

Es wurde überprüft, ob bei allen Proben die gleiche Menge Proteine aufgetragen wurden. Dies wurde durch den Nachweis eines Kontrollproteins aus dem Zytoskelett der Zellen (β -Aktin oder α -Tubulin) gemacht. Der entsprechende Antikörper (β -Aktin (13E5) Rabbit monoclonal Antibody (mAB) von Cell Signaling; α -Tubulin Rabbit polyclonal AB von Biozol) wurde in TBS mit 0,5% Western Blocking Reagent 1:20000 verdünnt. Die Membran wurde mit TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (HRP-konjugierter Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins von Dako) geschah analog der ersten Detektion. Danach wurde die Membran wieder dreimal mit TBST gewaschen und mit dem ECL-Plus-Kit detektiert. Bei der Entwicklung wurde der Film deutlich kürzer auf die Membran gelegt, weil das Signal viel stärker war (höhere Konzentration der Kontrollpeptide). Die Ergebnisse des Western Blots wurden nur dann als gültig betrachtet, wenn eine homogene Beladung nachgewiesen wurde.

2.2.7 Messungen der Zytotoxizität

Um festzustellen, inwieweit das Bienengift eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hat, wurden verschiedene Messungen durchgeführt.

2.2.7.1 LDH-Test

Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein Zellenzym, das die chemische Umwandlung von Pyruvat in Laktat katalysiert. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Energiegewinnung durch Abbau von Kohlenhydraten. Dieses Enzym kommt bei

physiologischen Bedingungen nur intrazellulär vor und wird bei Zellschaden oder -tod freigesetzt. Dank dieser Eigenschaften eignet es sich als Marker für abgestorbene oder schwer beschädigte Zellen. Ein Vergleich der Konzentrationen von LDH in den Überständen von unbehandelten und behandelten Zellen liefert verlässliche Information über ihren relativen Zustand. Um diese Konzentrationen zu messen, wurde der Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche verwendet. Von den Zellüberständen, die nach Ablauf der entsprechenden Experimente gemessen werden sollten, wurden je 100 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Es wurde ein Mastermix zubereitet, der (für 25 Tests) aus 62,5 µl von Flasche 1 und 2,81 ml von Flasche 2 bestand. Von ihm wurden 100 µl pro Well zu den Proben zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente EpiLife Medium. Gemessen wurde am Photometer bei 492 nm mit Referenzwellenlänge 620 nm.

2.2.7.2 CellTiterBlue

Mit dem CellTiterBlue (CTB, Promega) wurde die Anzahl der metabolisch aktiven und demzufolge lebenden Zellen in verschiedenen Wells einer Platte verglichen. Dabei handelt es sich um ein Reagenz, das seine Farbe ändert, wenn es von Zellen verstoffwechselt wird. Bei dem Vergleich von Zellkolonien spricht eine stärkere Farbänderung für mehr metabolisch aktive und dementsprechend lebende Zellen. In der Kultur wurde nach der Behandlung mit Bienengift das Medium der Zellen gewechselt. Zu jedem Well wurde 100 µl CellTiterBlue pro 500 µl Medium zugegeben und bis zu zwei Stunden bei 37°C inkubiert. 100 µl pro Well wurden abgenommen und in eine 96-Well Platte überführt. Es wurde am Photometer bei 560 nm mit Referenzwellenlänge 600 nm gemessen.

2.2.7.3 Kristallviolett Färbung

Eine weitere Methode, die Dichte der Zellen in den verschiedenen Wells einer Schale zu vergleichen, war die Kristallviolett-Färbung. Sie basiert darauf, dass Zellen vor der entsprechenden Behandlung gleichmäßig in einer Schale verteilt

waren. So konnte man Unterschiede in der Zelldichte danach direkt auf diese Behandlung zurückführen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. 300 µl Kristallviolett Lösung (0,5% Kristallviolett in 20 % Methanol, filtriert) wurden pro Well zugegeben und es wurde 15 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farblösung wurde entfernt, die unspezifische Färbung wurde mit Wasser ausgespült und die Platten wurden bei Raumtemperatur über Nacht offen gelassen, damit sie austrocknen. Am nächsten Tag wurden 300 µl Natriumcitrat-Lösung (0,1 M Natriumcitrat-Lösung in 50% Ethanol) pro Well gegeben und 10 Minuten inkubiert, bis das Kristallviolett von den gefärbten Zellen gelöst wurde. Je mehr Zellen es in einem Well gab, desto mehr Farbe wurde in die Lösung freigegeben. Die Unterschiede wurden am Photometer bei 550 nm erfasst.

2.2.8 Apoptosebestimmung von NHEK

2.2.8.1 Theoretischer Hintergrund der Annexin V-Propidiumjodid

Doppelfärbung

Bei der Apoptose kommt es in den Zellen zu einer Reihe von Ereignissen wie Verlust der Membranasymmetrie, Kondensation des Zytoplasma und des Zellkernes, Austritt von DNA aus dem Kern usw. Eine der ersten Indikationen für den programmierten Zelltod ist die Externalisation des Phospholipids Phosphatidylserin. Bei lebenden Zellen kommt Phosphatidylserin nur auf der Innenseite der Membran vor und bei der Einleitung der Apoptose wird es nach außen transloziert.

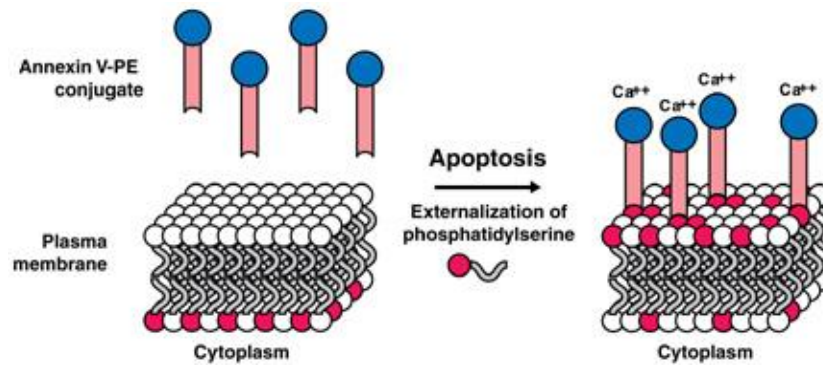


ABBILDUNG 5: Schematische Darstellung der Detektion von Apoptose

In der frühen Apoptose wird das Phospholipid Phosphatidylserin externalisiert und durch Annexin V gebunden.

Entnommen aus BD Sciences (<http://www.bdbeuropa.com/>)

Dort kann es sehr effektiv mit Annexin V, ein 35 kDa großes, Ca^{++} -abhängiges Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin, nachgewiesen werden. Erst später im Ablauf der Apoptose geht die Membranintegrität verloren und es kommt zur Fragmentierung der DNA. Da die Externalisation von Phospholipiden auch bei der Nekrose vorkommen kann, ist Annexin V kein spezifischer Marker für Apoptose. Deswegen wird es in Kombination mit Propidiumjodid (PI) verwendet, das an Nukleinsäuren bindet aber die Zellmembran nur dann durchdringen kann, wenn diese Defekte aufweist. Das kann entweder in der späten Apoptose oder bei der Nekrose passieren. Beobachtet man die Doppelfärbung über die Zeit, sieht man am Anfang der Apoptose nur eine Bindung von Annexin V, wogegen am Ende der Apoptose und bei der Nekrose eine Bindung sowohl von Annexin V als auch von PI zu beobachten ist.

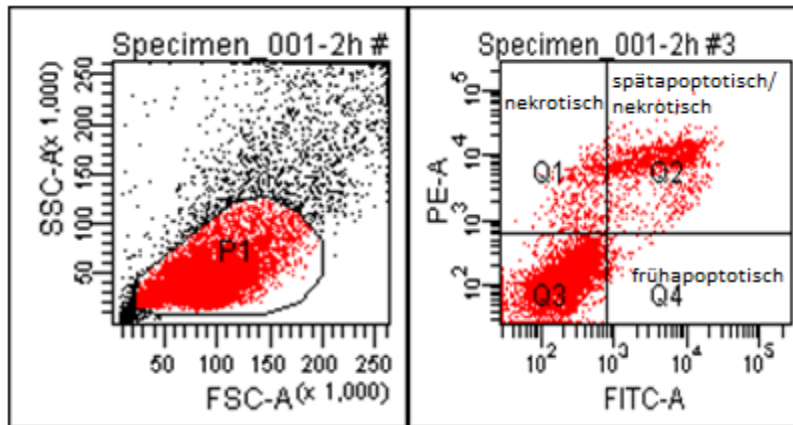


ABBILDUNG 6: FACS Messung der doppeltgefärbten Zellen

Die Annexin V (FITC-A) positiven und PI (PE-A) negativen Zellen sind frühapoptotisch, die Doppeltpositiven sind spätapoptotisch oder nekrotisch und die PI-positiven und Annexin V-negativen sind rein nekrotisch.

Abbildung (Abb.) aus den eigenen FACS Analysen (NHEK vom 16.03.10)

2.2.8.2 FACS-Analyse

Es wurde der Annexin V Fitc Apoptose Detection Kit II von BD Biosciences verwendet. Der Überstand der Zellen wurde nach dem Versuch in 15ml FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 250 μ l Trypsin-EDTA nach 10 minütiger Inkubation abgelöst. Nach Zugabe von 250 μ l Trypsin Neutralizer und 500 μ l EpiLife Medium wurde die Zellsuspension mit dem Überstand gepoolt. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C für vier Minuten. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 2,5ml kaltem PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C für vier Minuten wurde das PBS abgesaugt. 100 μ l 1x Binding Buffer wurde zugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und mit 5 μ l Annexin V und 5 μ l PI pro Röhrchen gefärbt. Zusätzlich wurde als Kontrolle ein Röhrchen mit ungefärbten, eins nur mit Annexin V-Fitc und eins nur mit PI gefärbten Zellen vorbereitet. Die Zellen wurden 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde je nach Zellzahl 200-400 μ l 1x Binding Buffer in jedes

Röhrchen zugegeben und gevortext. Die Messung wurde innerhalb einer Stunde nach der Färbung am BD FACS Canto durchgeführt und mit der BD FACSDIVA Software ausgewertet. Die Kontrollen wurden genutzt, um die Sensitivität der Kanäle des FACS einzustellen und eine Überlappung durch passende Kompensation möglichst auszuschließen. Die Grenzen für eine spezifische Anfärbung mit Annexin V bzw. PI wurden über eine deutliche Zunahme gegenüber der unspezifischen Fluoreszenz der Leerwerte bestimmt. Pro Probe wurden 10000 Zellen im schnellen Durchlauf gemessen. Die Population der ganzen Zellen wurde abgegrenzt, um eine Auswertung von Zelldebris zu vermeiden. Die Werte von den beiden Kanälen wurden logarithmisch dargestellt.

2.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) verwendet. Bei allen Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die statistischen Unterschiede wurden mittels Unpaired t Test bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0,05$ gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Bienengift induziert IL-1 β Ausschüttung *in vitro* und *ex vivo*

Bienengift verursacht bekannterweise eine lokale Entzündung in der menschlichen Haut. Liegt keine Allergie vor, wird die Inflammation allein von dem angeborenen Immunsystem verursacht, wobei unklar ist, welche PRRs daran beteiligt sind. Um feststellen zu können, ob dabei das Inflammasom eine Rolle spielt, wurden humane Keratinozyten (NHEK) mit verschiedenen Konzentrationen von Gift für 24 Stunden stimuliert. Die Zellen wurden mit TNF α vorinkubiert (24 Stunden mit 10 ng/ml), um die intrazelluläre Konzentration von pro-IL-1 β zu erhöhen, dessen Expression NF κ B-abhängig induziert wird. Dabei konnte mittels ELISA eine IL-1 β Sekretion nachgewiesen werden, die von der Bienengift-Dosis abhängig war (Abb. 7).

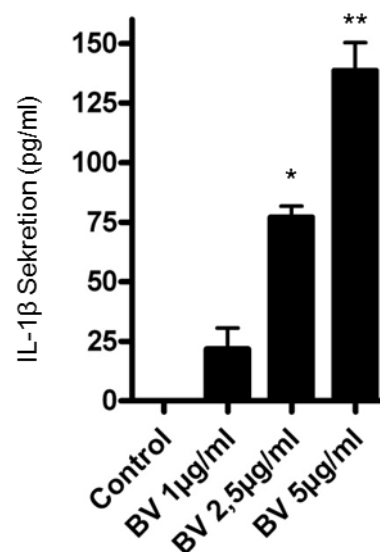


ABBILDUNG 7: IL-1 β Sekretion von NHEK

Die Stimulation der Zellen erfolgte nach TNF α Vorinkubation (24 Stunden mit 10 ng/ml) mit jeweils 0 (als Kontrolle), 1, 2,5 und 5 μ g/ml Bienengift und dauerte 24 Stunden. Die Konzentration von IL-1 β im Zellüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. Repräsentatives Beispiel. (N=3; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P<0.001)

Die Expression von pro- IL-1 β wurde gemessen um festzustellen, ob Bienengift die transkriptionelle Ebene der Interleukins beeinflusst (Abb. 8). Es konnte keine signifikante Induktion mit ansteigender Konzentration des applizierten Giftes nachgewiesen werden, was für eine Prozessierung und Ausschüttung des in den Zellen bereits gespeicherten Interleukins spricht.

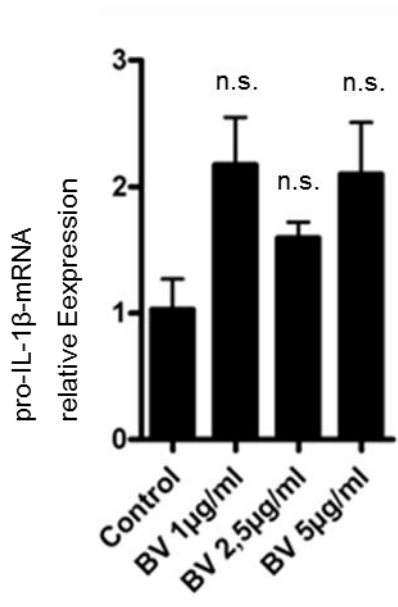


ABBILDUNG 8: relative mRNA Expression von pro- IL-1 β

Aus den mit Bienengift behandelten Zellen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Pro- IL-1 β Expression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Die Expressionsunterschiede wurden anhand der ermittelten Werte für Referenz (PBGD)- und Zielgen (Pro- IL-1 β) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. Repräsentatives Beispiel. (N=2)

Weiterhin wurde die Zytotoxizität des Bienengiftes durch eine Messung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfasst, die mit TNF α (24 Stunden mit 10 ng/ml) vorinkubiert und mit BV (1, 2,5 und 5 μ g/ml) behandelt wurden (Abb. 9). Dies geschah mit Hilfe des Cytotoxycity Detection Kit (LDH). Ein ansteigender Zellschaden wurde mit zunehmender Konzentration des Giftes im Zellmedium festgestellt. Bei dieser Messung wurde die Konzentration 2,5 μ g/ml als geeignet für die weiteren Stimulationen gewählt, da sie einen Kompromiss zwischen ausreichender IL-1 β Sekretion und möglichst geringer Schädlichkeit für die Zellen darstellt.

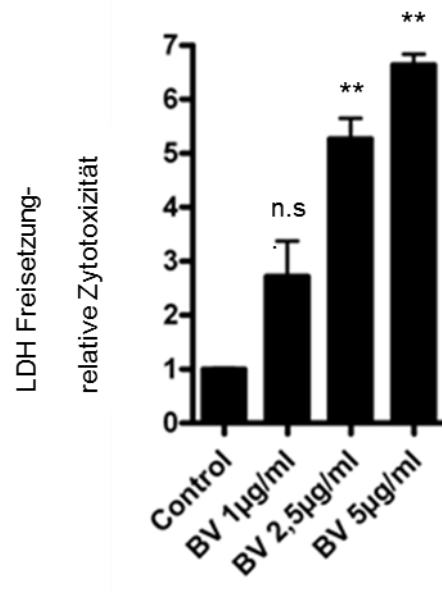


ABBILDUNG 9: Relative Zytotoxizität

Nach der Inkubation mit Apitoxin wurde die Aktivität von LDH im Medium der Zellen gemessen. Daraus wurde die relative Zytotoxizität berechnet, wobei die Aktivität bei den unbehandelten Zellen als Referenzwert verwendet wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. Repräsentatives Beispiel. (N=3)

Die Ergebnisse der LDH-Messung ließen sich durch eine Kristallviolett-färbung bestätigen (Abb. 10). Bei gleicher Vorbehandlung wurde die Zelldichte anhand des Farbverhaltens der Zellkulturen bestimmt. Nach einer 15 minütigen

Inkubation mit der Farblösung wurde die überschüssige Farbe abgeswaschen, die Zellen 24 Stunden lang abgetrocknet und das von den Zellen aufgenommene Kristallviolett wurde wieder aufgelöst. Die Konzentration der so entstandenen Lösung wurde photometrisch bestimmt und korrelierte positiv mit der Zelldichte zum Zeitpunkt der Färbung.

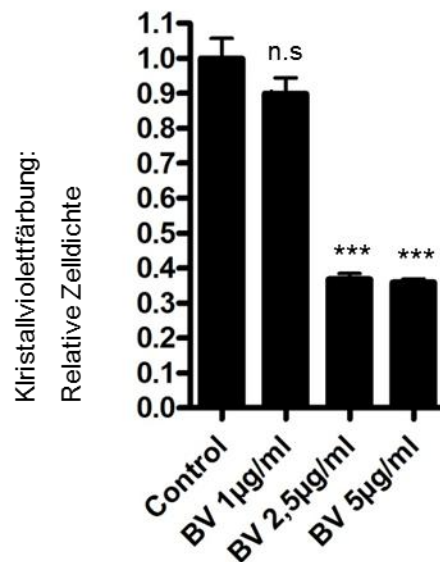


ABBILDUNG 10: Relative Zelldichte

Nach der Inkubation mit Apitoxin und der Kristallviolett-färbung (0,5% Kristallviolett in 20 % Methanol, 15 Minuten) wurden die Zellen mit Wasser gewaschen, ausgetrocknet und das immer noch vorhandene Kristallviolett wurde mittels Natriumcitrat-Lösung (0,1 M Natriumcitrat-Lösung in 50% Ethanol) gelöst. Die Konzentrationsunterschiede wurden Photometrisch (bei 550 nm) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten. Repräsentatives Beispiel. (N=2)

Es ist bekannt, dass bei einer Aktivierung des Inflammasoms nicht nur Interleukine, sondern auch zum Teil die Komponenten des Komplexes, wie z. B. ASC und Caspase 1 selber freigesetzt werden. Es wurde überprüft, ob das auch bei der Behandlung von NHEK Zellen mit Bienengift der Fall ist. Nach der zuvor beschriebenen Vorinkubation mit TNF α und Behandlung mit BV, wurde die Proteinfraction sowohl in den Zelllysaten als auch in den Überständen isoliert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA Protein Assay Kit),

Elektrophorese und Blotting wurde die Caspase 1 mittels Antikörper (Caspase 1-p20 Rabbit, Verdünnung 1:1000) nachgewiesen. Eine relative Zunahme von Caspase 1 im Medium der stimulierten Zellen wurde festgestellt (Abb. 11). Gleichzeitig war eine Abnahme der in den Zellen enthaltenen Caspase 1 zu verzeichnen.

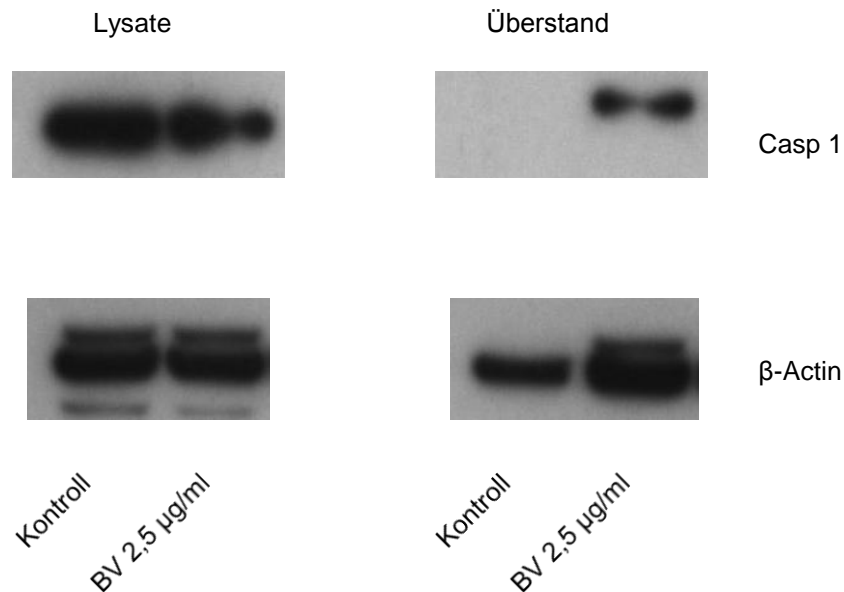


ABBILDUNG 11: Caspase 1 Sekretion von NHEK im Western Blot

Nach der Behandlung der NHEK mit BV (24 Stunden Inkubation mit 2,5 µg/ml) wurden die Proteine von den Überständen und von den Zellen isoliert und mittels Antikörper (Caspase 1-p20 Rabbit, Verdünnung 1:1000) detektiert. Im Western Blot war eine Zunahme der Konzentration von Caspase 1 im Medium und eine Abnahme im Zelllysate nach Applikation von Apitoxin zu sehen. Gleichzeitig wurde eine vergleichsweise gleichbleibende Konzentration von β -Aktin als Ladekontrolle dargestellt. Repräsentatives Experiment (N=2)

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebene Reaktion nicht nur in Zellkultur zu beobachten ist, sondern die Prozesse repräsentiert, die sich in der menschlichen Haut bei Stichen abspielen, wurden vier Versuche mit Hautstanzen in einem humanen ex vivo Hautmodell durchgeführt. Es handelte sich um symptomfreie Haut, die als gesund betrachtet wurde. In die

Hautstanzen wurde je 100 µl von den Giftzubereitungen oder 100 µl Wasser injiziert. Als Kontrolle wurde eine Hautstanze unbehandelt gelassen. Nach 6 stündiger Inkubation wurde die Konzentration von dem ins Medium freigesetzten IL-1 β mittels ELISA bestimmt. Dabei wurde eine von Patient zu Patient etwas unterschiedliche, aber in allen Fällen deutliche Zunahme der IL-1 β -Sekretion nach sechsstündiger Stimulation mit aufsteigender Bienengiftkonzentration nachgewiesen (Abb. 12).

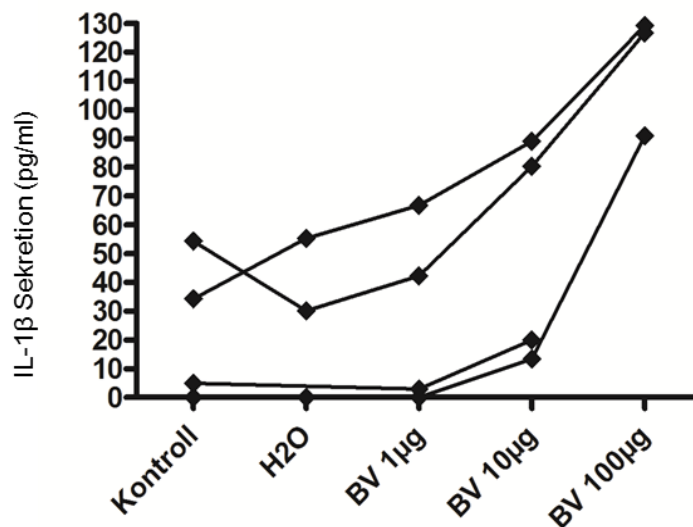


ABBILDUNG 12: IL-1 β Sekretion von Hautstanzen nach Stimulation mit Bienengift in einem Ex vivo Hautmodell

In die Hautstücke wurden unterschiedliche Mengen von dem in Wasser verdünnten Bienengift injiziert: 1, 10 und 100 µg. Die ELISA Messung von IL-1 β im Überstand wurde nach sechs Stunden Inkubation durchgeführt. Jede Kurve entspricht den Hautproben eines Patienten. Die als Control bezeichneten Proben wurden unbehandelt gelassen und in die H2O Proben wurde 100 µl Wasser injiziert. Die Stimulation mit 100 µg Gift entspricht in etwa einem Bienenstich.

Nach der oben beschriebenen Behandlung wurden die Stanzen histologisch aufgearbeitet. Die gefertigten Parafinschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt. In der Abb. 13 ist ein Hohlraum in der Dermis zu sehen, die sich bei der Injektion von Bienengift gebildet hat.

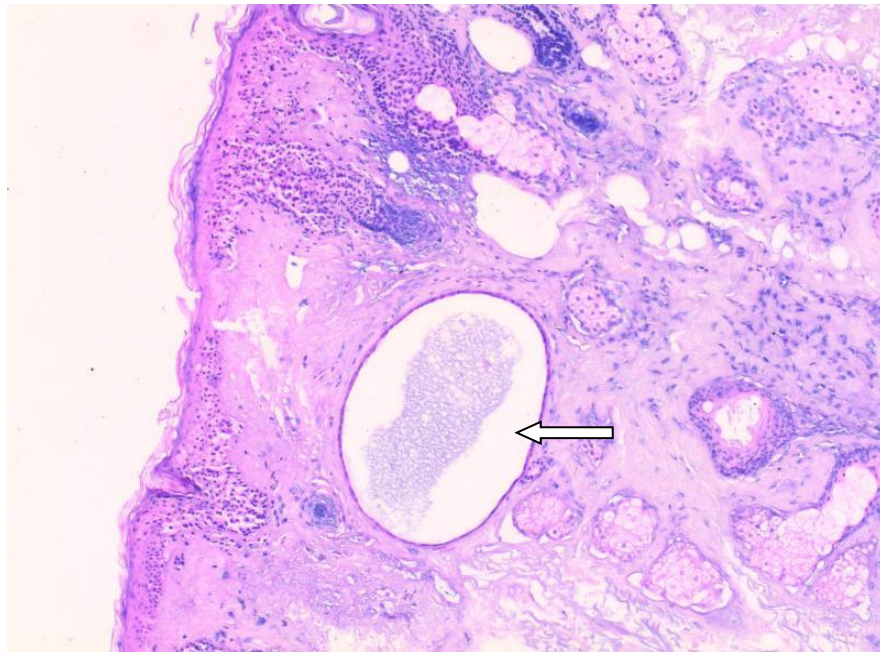


ABBILDUNG 13: HE-gefärbter Schnitt einer Hautstanze nach Injektion von Apitoxin

Nach Ablauf der Inkubationszeit von sechs Stunden wurde die Hautstanze histologisch aufgearbeitet (nach der Kryomethode), HE gefärbt und bei 100x Vergrößerung fotografiert. Zu sehen ist ein Hohlraum, der bei der Injektion entstanden ist.

3.2 Die IL-1 β Sekretion lässt sich durch Ausschalten von Caspase 1 und AIM2 hemmen

Nach dem Nachweis der durch das Bienengift verursachten erhöhten IL-1 β Sekretion, wurden weitere Versuche zur genaueren Identifikation der beteiligten Signalwege durchgeführt. Die Translation verschiedener Moleküle, die als Bestandteile der Inflammasome gelten, wurde durch siRNA Transfektion unterbrochen. Die relative Konzentration von AIM2, Caspase 1 und ASC RNA in den Zellen wurde nach Behandlung mit der jeweiligen entsprechenden siRNA gemessen. Ziel war zu kontrollieren, wie gut die verwendete Methode die Expression der entsprechenden Gene unterdrückt. Es wurden eine relative

Expression zwischen 17% und 55% bezüglich der Kontrolle (Zellen, die mit der kontroll-siRNA transfiziert wurden) gemessen, wobei die geringste Suppression bei AIM2 und die höchste bei ASC zu beobachten war (Abb. 14). Trotz der unvollständigen Ausschaltung von AIM2 zeigte diese Behandlung den größten Effekt auf die IL-1 β Sekretion.

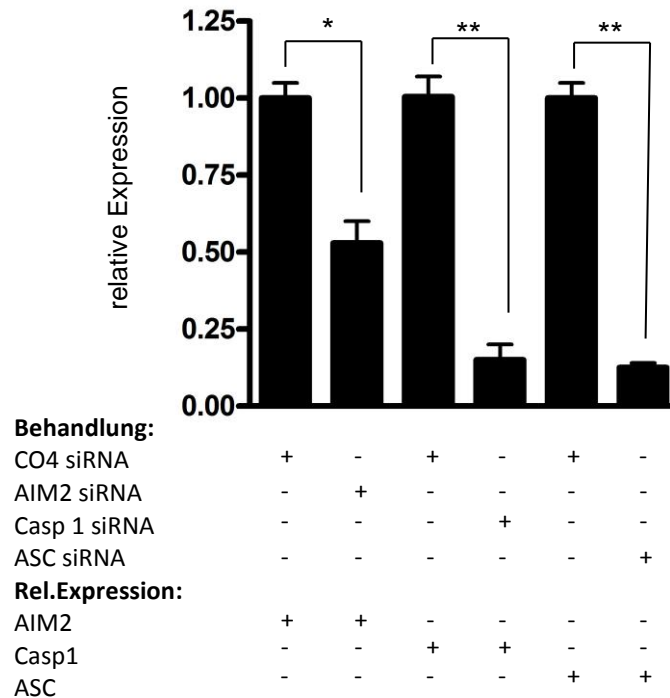


ABBILDUNG 14: Relative Expression von AIM2, Caspase 1 und ASC nach siRNA Transfektion

Die RNA der behandelten Zellen (48 Stunden Inkubation mit Transfektionslösung aus 0,24 μ g/ml siRNA, 1:100 Lipofectamine RNAiMAX Reagent; 1:5 in EpiLife Medium verdünnt) wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und im RT-PCR gemessen. Als Referenzwert wurde die Konzentration der entsprechenden RNA in den mit kontroll-siRNA behandelten Zellen angenommen. Die Expression von allen drei Genen konnte signifikant unterdrückt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. Repräsentatives Beispiel. (N=2)

NHEK Zellen, die mit den vier vorbeschriebenen siRNAs transfiziert waren, wurden als Nächstes zusätzlich mit Bienengift stimuliert. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die Suppression dieser Gene und somit die weitgehende

Ausschaltung der entsprechenden Inflammasombestandteile die Antwort der Zellen auf das Gift beeinflusst. Die Aktivierung und Freisetzung von IL-1 β konnte sehr effektiv durch AIM2 und Caspase 1 siRNA gehemmt werden, nicht aber durch NALP3 siRNA (Abb. 15). Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass das AIM2 Inflammasom durch Bienengift aktiviert wird. Überraschenderweise konnte die Ausschaltung des Adapterproteins ASC die Interleukin Sekretion nur teilweise reduzieren, obwohl es als unabdingbares Glied des Inflammasoms gilt.

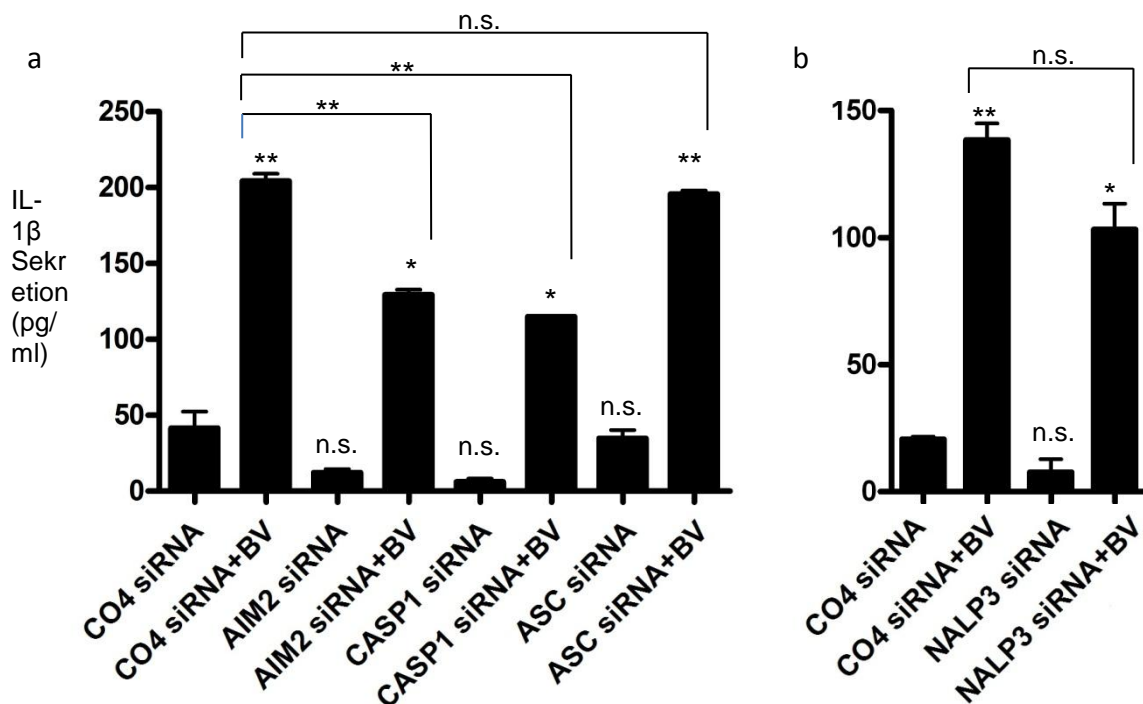


ABBILDUNG 15: Hemmung der IL-1 β -Sekretion durch Ausschalten von Inflammasombestandteilen mittels siRNA-Transfektion

Die Zellen wurden nach der siRNA-Transfektion (48 Stunden Inkubation mit Transfektionslösung aus 0,24 μ g/ml siRNA, 1:100 Lipofectamine RNAiMAX Reagent; 1:5 in EpiLife Medium verdünnt) mit TNF- α vorstimuliert (24 Stunden mit 10 ng/ml) und mit 2,5 μ g/ml Bienengift sechs Stunden inkubiert. Die Messung wurde in den Überständen mittels ELISA durchgeführt. Die unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 β bei den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen in den beiden Experimenten sind durch ungleiche Zelldichte zum Zeitpunkt der Bienengift-Exposition zu erklären. Dargestellt sind die Mittelwerte von

Duplikaten. Signifikanz bezogen auf CO4 siRNA bzw. auf CO4 siRNA+BV. Repräsentatives Beispiel. (N=3)

Die LDH Messung zeigte bei den Zellen, die mit AIM2, Caspase 1 und ASC siRNA behandelt wurden, eine Reduktion der Zytotoxizität im Vergleich zu den Kontrollzellen (Mittelwert). Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten der drei Gruppen (Abb. 16).

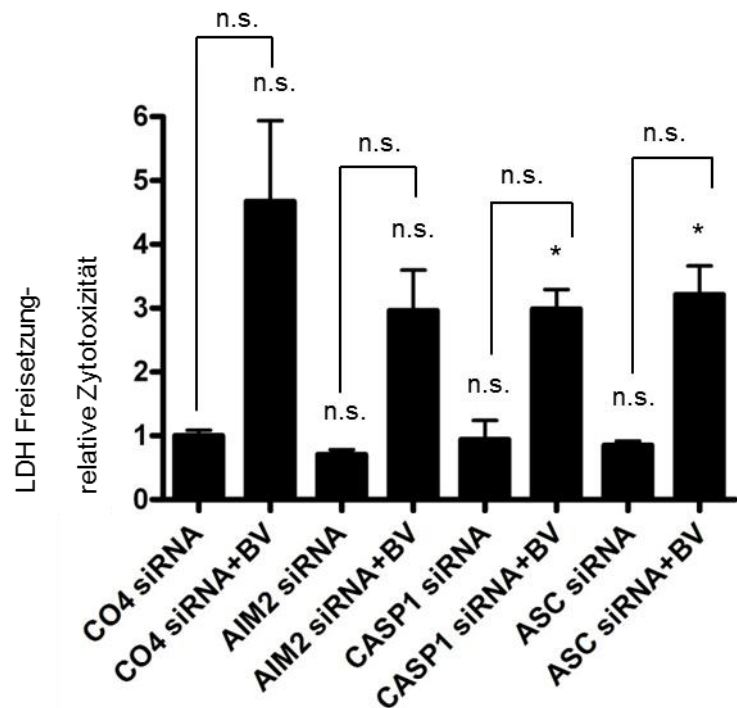


ABBILDUNG 16: Relative Zytotoxizität

Es wurden die LDH Konzentrationen in den Überständen von Zellen gemessen, die entweder allein mit einer siRNA oder mit der Kombination siRNA und Bienengift 2,5 µg/ml behandelt wurden. Dabei konnten die getesteten siRNAs keinen protektiven Effekt im Vergleich zu der kontroll-siRNA zeigen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. Repräsentatives Beispiel. (N=2)

3.3 Die Inflammasom- Aktivierung geschieht ASC-unabhängig

Da die Ergebnisse der Expressionsmessung keine Erklärung dafür lieferten, dass ASC siRNA die IL-1 β Ausschüttung nach Applikation von Bienengift nur unvollständig hemmt, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Es wurde zwar nachgewiesen, dass die siRNA ASC auf RNA-Ebene hemmt, aber es war immer noch unklar, ob das Protein selber auf diese Weise auch noch beeinflusst wurde. Eine Möglichkeit war, dass ASC besonders stabil ist und wegen längerer Halbwertszeit trotz fehlender Translation zum Zeitpunkt der Bienengiftstimulation immer noch in den Zellen vorhanden war. Um dies zu überprüfen, wurde das Vorhandensein des Proteins im Zelllysats überprüft (Abb. 17). Dabei wurde die Wirksamkeit zwei verschiedener, gegen ASC gerichteter siRNAs im Vergleich zu der Kontroll-siRNA getestet. Nach der siRNA Transfektion und einer 48 stündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Proteinfraction isoliert und ASC mittels Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle diente α -Tubulin, ein Strukturprotein, das von der Transfektion nicht beeinflusst wird. Es wurde nachgewiesen, dass ASC auch auf Proteinebene vollständig unterdrückt war. Dies könnte auf eine ASC-unabhängige Inflammasomaktivierung und IL-1 β -Sekretion hindeuten, die bislang noch nicht bekannt ist.

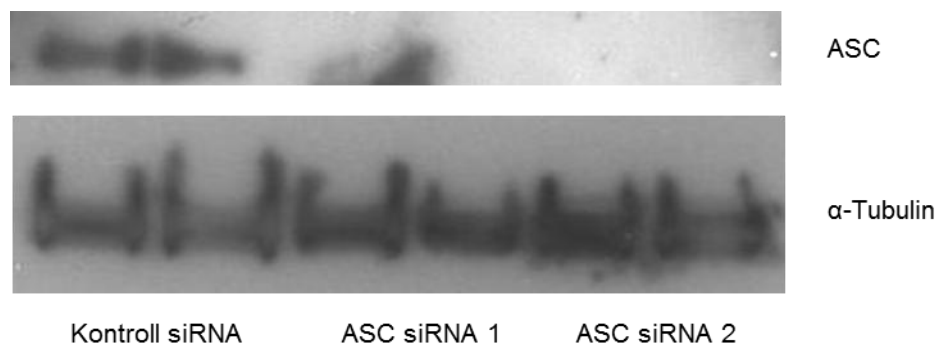


ABBILDUNG 17: ASC Expression nach siRNA Transfektion

Die Expression von ASC wurde auf Proteinebene mittels Western Blot erfasst. Dazu wurde die Proteinfraction im Zelllysats isoliert, einer Elektrophorese unterzogen, geblottet und mittels

Antikörper (Anti-Human-ASC monoclonal Antibody bzw. α -Tubulin Rabbit polyclonal AB) markiert. Die beiden ASC siRNAs zeigten ähnliche Ergebnisse. Bei der Färbung, die sich zwischen den zwei Banden der ASC siRNA 1 befindet, handelt es sich um ein Artefakt. Die gleichmäßigen α -Tubulin Banden sprechen für eine homogene Beladung.

3.4 Die im Überstand gelöste DNA ist nicht für die AIM2-Aktivierung verantwortlich

AIM2 ist bekannt als zytoplasmatischer DNA Rezeptor, aber es wurde bei den oben beschriebenen Experimenten vom Bienengift, das keine Nukleinsäuren enthält, aktiviert. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung war, dass DNA von gestorbenen und aufgelösten Zellen dank einer membranlockernden oder -lösenden Wirkung des Apitoxins in die lebenden Zellen gelangte und dort das AIM2 Inflammasom aktivierte. Dies wäre durch die bekannte Eigenschaft von Melittin, Poren in der Zellmembran zu bilden (137). Deswegen wurden im folgenden Versuch Zellen mit Bienengift allein, oder mit Bienengift und DNase behandelt. Auf diese Weise sollte die freie DNA abgebaut und dementsprechend die Wirkung des Giftes gestoppt werden. Es wurde die Konzentration von IL-1 β im Überstand der behandelten Zellen mittels ELISA gemessen (Abb. 18). Anstatt der erwarteten Abnahme, wurde bei der Kombination der Beiden sogar ein Anstieg registriert, der möglicherweise durch die zusätzliche schädigende Wirkung der DNase verursacht worden war.

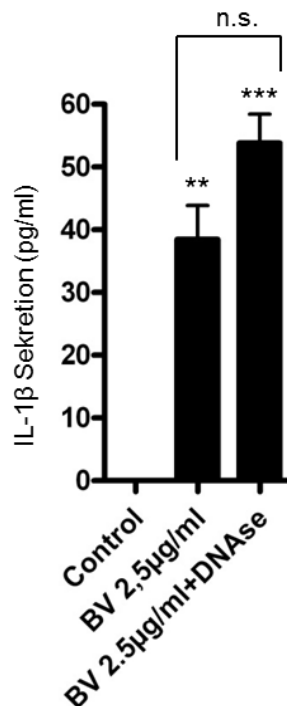


ABBILDUNG 18: IL-1 β Sekretion bei Behandlung mit Bienengift und DNase

Nach der Vorinkubation mit TNF α (24 Stunden mit 10 ng/ml) und der Behandlung mit BV (2,5 μ g/ml) und DNase (2 U pro 100 μ l Medium) für 6 Stunden wurde die IL-1 β Konzentration im Überstand durch ELISA ermittelt. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Sekretion bei den Zellen, die mit DNase und Apitoxin in Kombination behandelt wurden im Vergleich zu denen, die nur Gift appliziert bekommen haben. Bei den unbehandelten Zellen war das IL-1 β unter der Messgrenze. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. N=1

Um zu überprüfen, ob die DNase bei dem Versuch tatsächlich aktiv war, wurde sie zusätzlich mit genomischer DNA von Keratinozyten (Abb. 19) getestet. Zu genomischer DNA, gelöst in EpiLife Medium oder in Reaktionspuffer wurde DNase (2 U/100 μ l) zugegeben gelöst. Eine komplette Verdauung wurde sowohl bei dem Ansatz mit den gleichen Bedingungen wie im Experiment, als auch bei dem mit den optimalen Bedingungen (durch Reaktionspuffer) für das Enzym nachgewiesen.

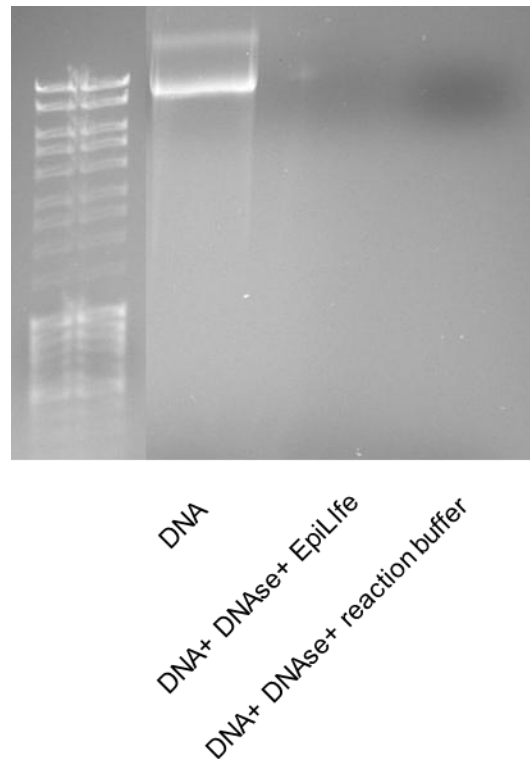


ABBILDUNG 19: Effektivität der DNase in EpiLife

Es wurden drei verschiedene Ansätze vorbereitet: genomische DNA von NHEK Zellen allein, mit DNase in EpiLife Medium und mit DNase in Reaktionspuffer (DNase 2 U/100 μ l, Reaction Buffer $MgCl_2$). Nach der einstündigen Inkubation wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Ergebnisse beweisen, dass die DNase auch in EpiLife Medium funktionstüchtig ist. N=1

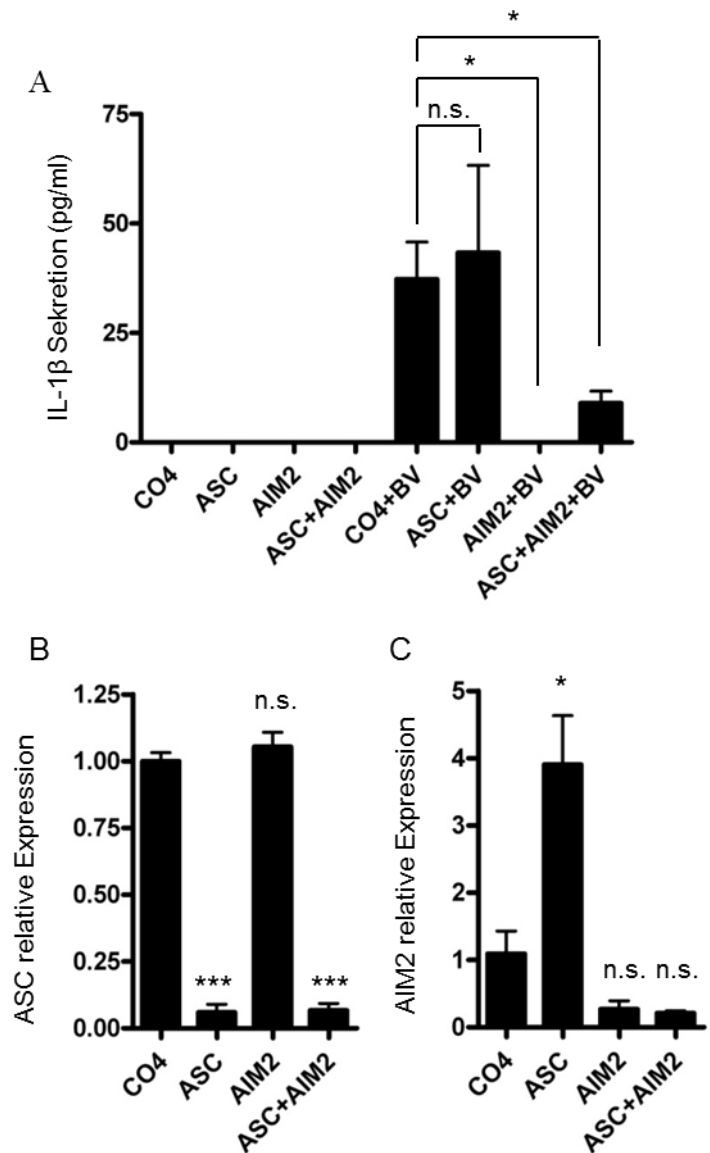
3.5 ASC-siRNA induziert die Expression von AIM2

Weiterhin wurde ein Versuch durchgeführt, um die Interaktion zwischen AIM2 und ASC zu testen. Ihre Expression wurde einzeln oder zusammen mittels siRNA Transfektion ausgeschaltet (48 Stunden Inkubation mit Transfektionslösung aus 0,24 μ g/ml siRNA, 1:100 Lipofectamine RNAiMAX Reagent; 1:5 in EpiLife Medium verdünnt). Die Zellen wurden mit TNF α (24 Stunden mit 10 ng/ml) vorinkubiert, mit Bienengift stimuliert (2,5 μ g/ml, 6 Stunden) und es wurden die IL-1 β Konzentration (mittels ELISA) und die

Expressionsmuster der von ASC und AIM2 (mittels qRT-PCR) gemessen (Abb. 20). Eine signifikante Reduktion der IL-1 β Konzentration im Medium im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde bei der Behandlung mit AIM2 und bei der Kombination von ASC und AIM2 siRNA festgestellt. Außerdem konnte im qRT-PCR eine Induktion von AIM2 (Anstieg der relativen Expression auf das 3,9-fache) bei den Zellen festgestellt werden, die mit ASC siRNA behandelt wurden. Das Umgekehrte wurde nicht beobachtet. Durch die Kombination der beiden siRNAs konnte dieser Effekt gehemmt werden.

ABBILDUNG 20: IL-1 β Sekretion und relative Expression von AIM2 und ASC bei Behandlung mit siRNA

A: IL-1 β ELISA von den Überständen der Zellen, die mit kontroll-, AIM2-, ASC-siRNA oder die Kombination von den letzten Beiden behandelt wurden. Die Ausschüttung vom Interleukin wurde mit AIM2 siRNA völlig und mit der Kombination größtenteils gesenkt. **B:** Die relative Expression von ASC wurde im qRT-PCR gemessen und konnte mit ASC- siRNA und mit der Kombination gleichermaßen gehemmt werden. Die AIM2- siRNA hatte keinen Einfluss. **C:** Die Expression von AIM2 wurde mit AIM2-siRNA und mit der Kombination auf 20% herunterreguliert und mit ASC-siRNA auf das 3,9-fache induziert. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten. N=2



3.6 Bienengift verursacht Apoptose

Es wurde mittels LDH-Messungen nachgewiesen, dass Bienengift zytotoxisch ist. Um diese schädigende Wirkung etwas genauer differenzieren zu können, wurden mittels FACS die apoptotischen und die nekrotischen Subpopulationen von Zellen bestimmt, in denen verschiedene Inflammasom-komponente supprimiert wurden und die mit Gift behandelt wurden. Nach einer siRNA

Transfektion (48 Stunden Inkubation mit Transfektionslösung aus 0,24 µg/ml siRNA und 1:100 Lipofectamine RNAiMAX Reagent; 1:5 in EpiLife Medium verdünnt) und einer TNFα Vorinkubation (24 Stunden, 10 ng/ml) wurden die Zellen mit BV (2,5 µg/ml, 2 bzw. 6 Stunden) stimuliert. Alle Zellen (inklusive die im Überstand abgelösten) wurden isoliert und mit Annexin V und PI gefärbt. In der FACS-Analyse wurde festgestellt, dass die Mehrzahl der absterbenden Zellen den Weg der Apoptose geht (Abb. 21). Weder die AIM2-, noch die ASC- und Caspase 1- siRNAs hatten einen Einfluss auf die Apoptose und erwiesen sich dementsprechend nicht als protektiv für die Zellen. Außerdem wurde die Beobachtung gemacht, dass die Apoptose sehr schnell nach der Applikation von Apitoxin induziert wird. Zusätzlich wurde die IL-1β Konzentration im Überstand der Zellen durch ELISA gemessen, um zu überprüfen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Induktion von Apoptose und der Aktivierung des Inflammasoms besteht. Dieser konnte nicht bestätigt werden. Bei den am stärksten betroffenen Zellen- die, die mit AIM2- siRNA transfiziert wurden- konnte keine Ausschüttung von IL-1β registriert werden.

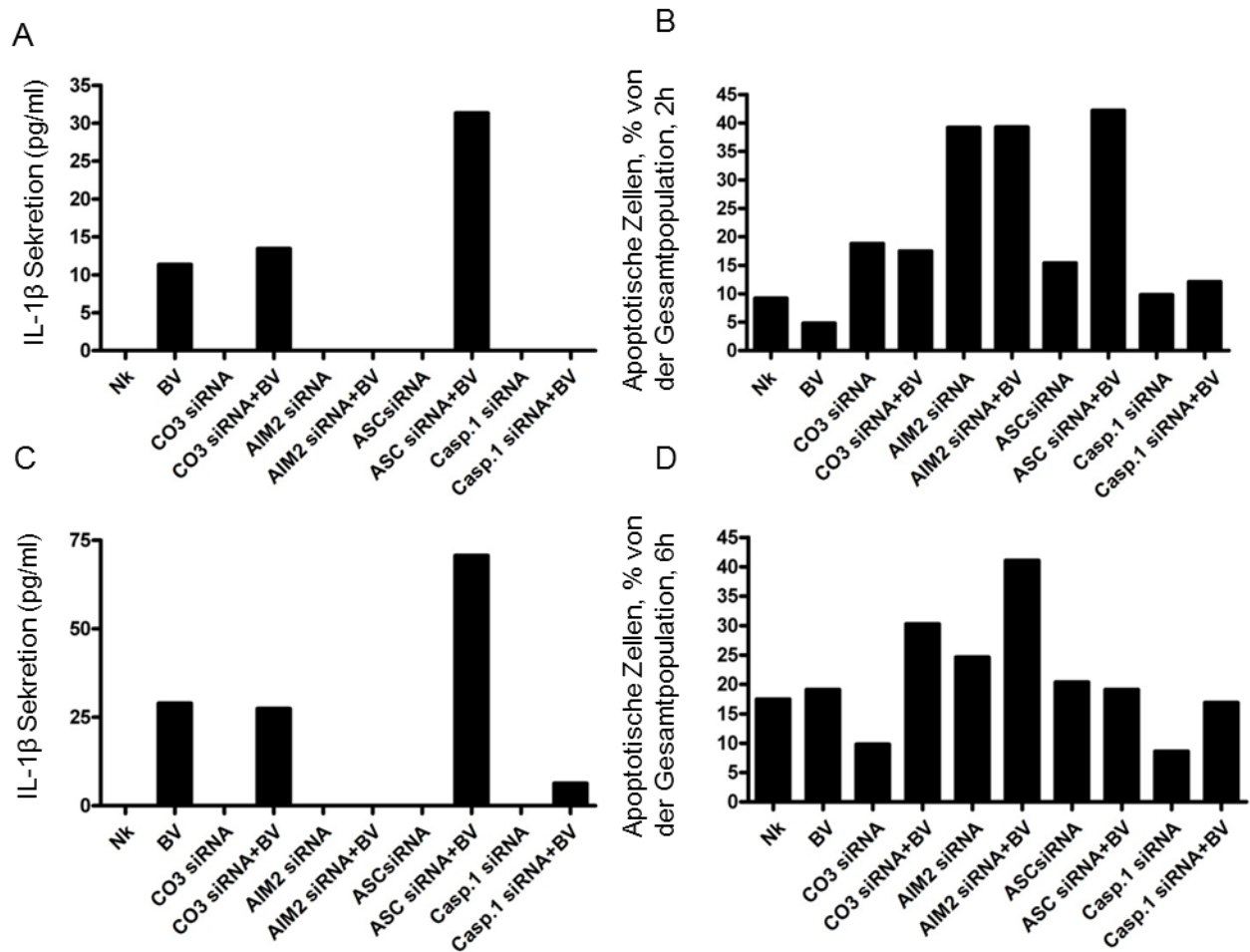


ABBILDUNG 21: IL-1 β Sekretion und Anteil der apoptotischen Zellen von der Gesamtpopulation nach CO3, AIM2, ASC und Caspase 1 siRNA Transfektion und Bienengift Applikation

Die Zellen wurden mit kontroll-, AIM2-, ASC- oder Caspase 1- siRNA behandelt und danach für zwei (**A, B**) oder für sechs (**C, D**) Stunden mit Bienengift inkubiert. Danach wurde die IL-1 β Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen und der Anteil an apoptotischen Zellen mit FACS bestimmt. Die ELISA-Ergebnisse entsprachen denen der oben beschriebenen Versuche. Im FACS konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bei den mit kontroll-, AIM2 und ASC- siRNA transfizierten Zellen nach der zweistündigen Giftinkubation eine signifikante Zunahme der Apoptose nachgewiesen werden. Nach der sechsstündigen Inkubation lagen alle Werte näher beieinander und es konnte nur noch die besonders schädigende Wirkung von AIM2 siRNA und Bienengift in Kombination bestätigt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten. Repräsentatives Beispiel. N=2

3.7 Die Aktivierung des Inflammasoms geschieht durch Melittin

Da das Bienengift eine komplexe Mischung verschiedener Proteine und kleinmolekulärer Verbindungen ist, die zum Teil ganz unterschiedliche Wirkungen auf den menschlichen Körper haben, war es unklar, welche Komponente für die AIM2-Aktivierung verantwortlich ist. Um das herauszufinden, wurden Versuche mit Melittin, Apamin und PLA2- den Hauptbestandteilen des Giftes - durchgeführt. NHEK Zell-Ansätze wurden nach TNF α Vorinkubation mit Ganz-Bienengift (2,5 $\mu\text{g/ml}$) als Positivkontrolle, oder mit je einem der drei Proteine in den folgenden Konzentrationen stimuliert: Melittin: 5 $\mu\text{g/ml}$, Apamin: 1 $\mu\text{g/ml}$ und PLA2: 1 $\mu\text{g/ml}$. Bei den ELISA-Auswertungen nach 2, 6 und 24 Stunden führte jeweils nur das Melittin zu einer erhöhten IL-1 β Sekretion, die jedoch im Vergleich zu der Positivkontrolle um 15% bis 60% geringer war (Abb. 22).

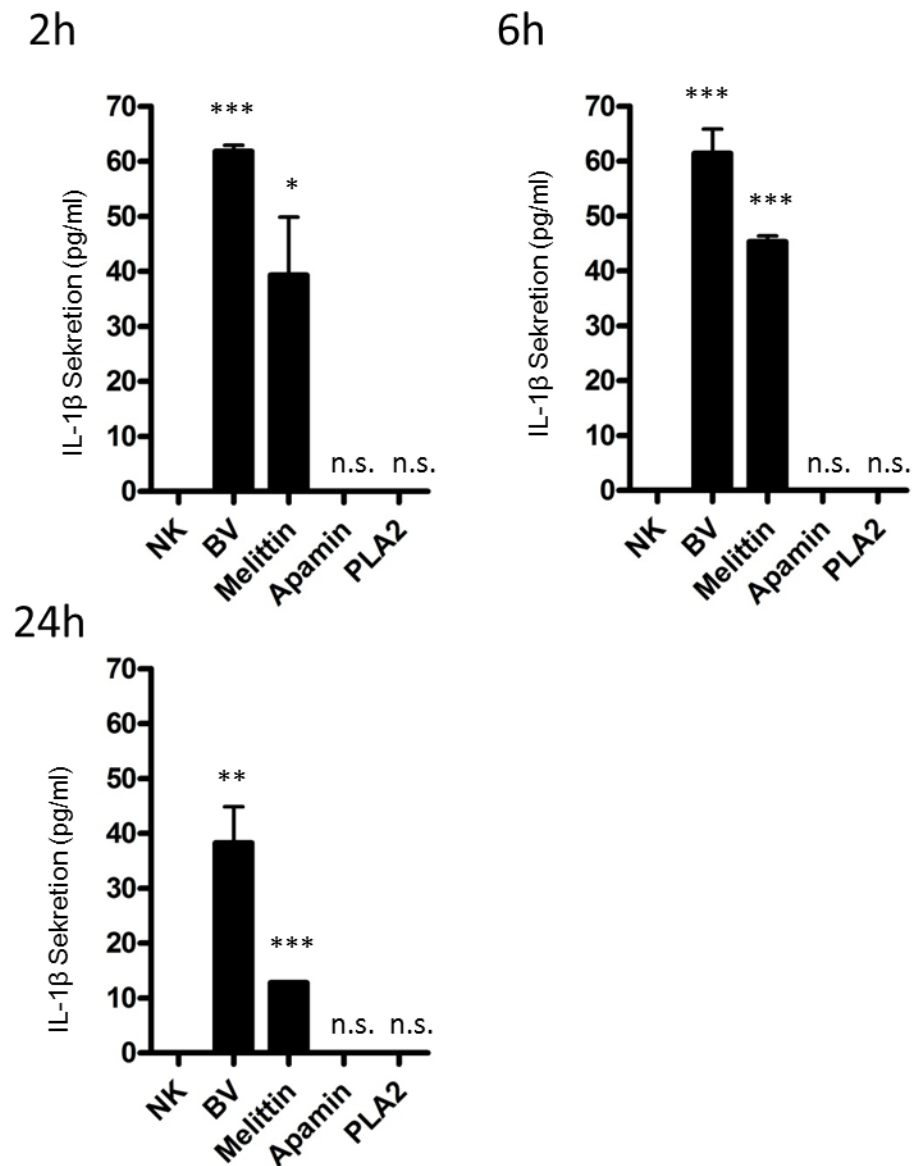


ABBILDUNG 22: IL-1 β Sekretion nach Stimulation mit Bienengift-Bestandteile

Die IL-1 β Konzentration wurde mittels ELISA in den Überständen von NHEK Zellen ermittelt, die nach der TNF α Vorinkubation mit Melittin (5 μ g/ml), Apamin (1 μ g/ml) oder PLA2 (1 μ g/ml) stimuliert wurden. 100 μ l Proben wurden nach zwei, sechs und 24 Stunden Inkubation abgenommen und gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur die TNF α -Vorbehandlung und als Positivkontrolle Zellen, die BV-Stimulation (2,5 μ g/ml) erhalten haben. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten. Repräsentatives Beispiel. N=2

Als Nächstes wurde die Frage geklärt, welche der Bestandteile für die zytotoxische Wirkung des Giftes verantwortlich waren. Um das herauszufinden wurde eine Zellviabilitätsassay mit dem CellTiterBlue Reagent durchgeführt (Abb. 23). Dabei wurde der Reagent von den noch metabolisch aktiven Zellen verstoffwechselt, was zu einer Farbänderung führte. Dies hat eine quantitative Abschätzung der Zytotoxizität im Vergleich zu der Negativkontrolle zugelassen. Die Zellen wurden mit TNF α vorinkubiert, und mit BV (2,5 μ g/ml), Melittin (5 μ g/ml), Apamin (1 μ g/ml) oder PLA2 (1 μ g/ml) 24 Stunden lang stimuliert. Durch Anfügen des Reagents, einer einstündigen Inkubation und Photometrischer Auswertung wurde festgestellt, dass Melittin die Einzige der getesteten Substanzen war, die eine negative Wirkung auf die Anzahl der lebenden Zellen hatte. Dabei war der Effekt vergleichbar mit dem des ganzen Bienengiftes.

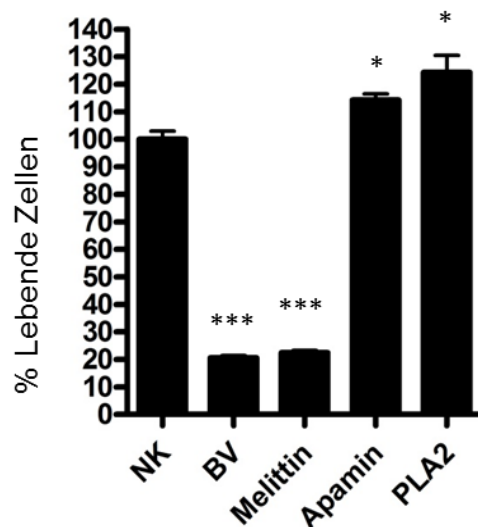


ABBILDUNG 23: Zellviabilität nach Behandlung mit Bienengift und Bestandteilen

Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubation wurde der Überstand abgenommen, neues Medium und CellTiterBlue Reagent (100 μ l pro 500 μ l Medium) zugegeben. Die Viabilität der Zellen wurde nach 1 Stunde Inkubation photometrisch bei 560 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten. Repräsentatives Beispiel. N=2

3.8 Die IL-1 β -Sekretion der Keratinozyten nach Behandlung mit Melittin erfolgt AIM2-abhängig

Es wurde nachgewiesen, dass Melittin für die IL-1 β Sekretion der NHEK Zellen bei Behandlung mit Bienengift verantwortlich ist. Die Möglichkeit war aber noch nicht ausgeschlossen, dass ein anderer Bestandteil, und nicht das Melittin selbst, die Aktivierung des AIM2 Inflammasoms beeinflusst. Um dies auszuschließen wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Expression von AIM2 und ASC in NHEK Zellen mittels siRNA Transfektion supprimiert wurde, worauf eine Vorinkubation mit TNF α und eine 6-stündige Stimulation mit BV (2,5 μ g/ml) bzw. mit Melittin (5 μ g/ml) erfolgten. Die IL-1 β Konzentration wurde im Überstand mit ELISA gemessen (Abb. 24). Die Sekretion des Interleukins konnte in beiden Fällen nur mit der AIM2 siRNA signifikant gehemmt werden.

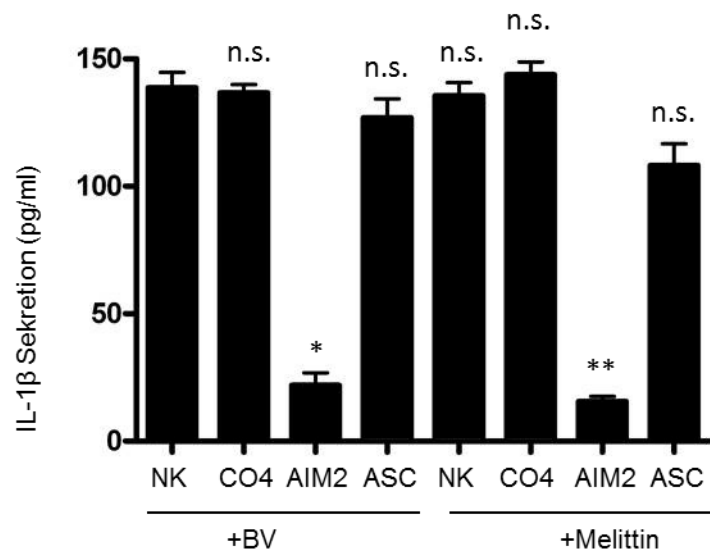


ABBILDUNG 24: IL-1 β Sekretion nach siRNA Transfektion und Bienengift/Melittin Stimulation

Nach der siRNA Transfektion (48 Stunden Inkubation mit Transfektionslösung aus 0,24 μ g/ml siRNA und 1:100 Lipofectamine RNAiMAX Reagent; 1:5 in EpiLife Medium verdünnt) wurden die Zellen mit TNF α vorstimuliert und 6 Stunden lang mit ganzem Bienengift (2,5 μ g/ml) oder

nur mit Melittin (5 µg/ml) inkubiert. Die IL-1 β Konzentration wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. Mit NK sind die Zellen bezeichnet, die keine siRNA Transfektion erhielten. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten. Repräsentatives Beispiel. N=2

4 Diskussion

4.1 Die Inflammasome

Das menschliche Immunsystem besitzt zahlreiche Mechanismen und Strukturen, die der Bekämpfung von schädigenden Einflüssen, wie mikrobiellen Erregern, dysplastischen oder fremden Zellen und toxischen Substanzen, dienen. Als Erstes kommt die Haut als mechanische Barriere, die den Körper von den äußeren Einflüssen isoliert (138). Wird sie beschädigt und durchdrungen, so wird das angeborene Immunsystem in Gang gesetzt, das in der Lage ist, schnell zu reagieren und die meisten Pathogene zu eliminieren. Diese Effektivität kommt einerseits durch eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren, die die Eindringlinge schnell detektieren können, und andererseits durch spezialisierte Zellen und Stoffe, die deren Neutralisierung dienen, zustande (44). Bisher wurden einige Typen von Rezeptoren, die sog. Pattern Recognition Receptors, identifiziert. Dazu zählen die membranständigen Toll-Like Rezeptoren (TLRs) und Mannose Rezeptoren (MRs), die zytosolischen RIG-like Helicasen und NOD-like Rezeptoren und die extrazellulären Komplement-Rezeptoren, Collectine und Pantrexine (139)-(141), (30).

Einige dieser PRRs sind in der Lage, bei der Signaltransduktion die Bildung großer zytoplasmatischer Komplexe namens Inflammasome zu induzieren. Die Inflammasome und speziell das AIM2-Inflammasom wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Sie spielen eine sehr wichtige Rolle in der angeborenen Immunität, indem sie eine Reihe von verschiedenen, potenziell gefährlichen, Substanzen aufspüren und eine entsprechende Immunantwort einleiten.

Es gibt Hinweise, dass das unspezifische Immunsystem nicht nur in der Lage ist, fremd von selbst zu unterscheiden, sondern auch zwischen pathogenen und

nichtpathogenen Mikroorganismen zu diskriminieren. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die sog. Gefahren-Hypothese. Sie besagt, dass die alleinige Antigenpräsentation nicht ausreicht, um eine Immunantwort einzuleiten, sondern zusätzlich ein Gefahrensignal nötig ist (10). Die Inflammasome scheinen u.a. für die Registrierung dieses Signals verantwortlich zu sein. Da sie sich im Zytosol befinden, sind sie nicht nur auf die Erkennung von lebenden Bakterien und Viren spezialisiert, die ins Zellinnere vordringen, sondern vielmehr auch auf die Identifizierung der Abbauprodukte, die bei deren Phagozytose entstehen (142). Es handelt sich dabei um die sog. PAMPS-hochkonservierte und für die Mikroorganismen essenzielle Strukturen. Außerdem spüren Inflammasome verschiedene chemische Verbindungen auf, z.B. bakterielle Toxine (143). Unklar ist jedoch, ob sie mit den diversen Aktivatoren direkt interagieren oder bestimmte Faktoren zwischengeschaltet sind, die unspezifisch bei Zell- und Gewebsschädigung entstehen (41). Als wichtig für die Aktivierung der Inflammasome wurden identifiziert: die Phagozytose selber, die darauf gebildeten ROS (reactive oxygen species), die intrazelluläre K^+ - und ATP- Konzentration u.v.a. (44). Ein umfassendes Verständnis über ihre Expression, Regulation und Aktivierung fehlt jedoch bislang noch.

Das AIM2 Inflammasom ist bekannt als intrazellulärer Rezeptor, der doppelsträngige DNA bindet und die Caspase 1 aktiviert. Für die Signalübertragung gilt das Adapterprotein ASC als notwendig (59)-(60). Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Funktion von Inflammasomen in der menschlichen Haut und insbesondere von AIM2 in Bezug auf die inflammatorische Wirkung des Bienengifts.

4.2 Funktionen der Inflammasome in der Haut

Die vertiefte Erforschung der Haut als Organ bringt immer mehr Erkenntnisse über ihre hochkomplexen immunologischen Funktionen. An der Grenzzone zu der Außenwelt sind nicht nur spezialisierte Immunzellen im klassischen Sinne des Wortes, sondern auch die Keratinozyten an der Abwehr beteiligt (1)-(3). Dabei haben u.a. auch die Inflammasome mehrere wichtige Funktionen. So wurde gezeigt, dass das NALP3 Inflammasom nach UV-Bestrahlung aktiviert wird und zur Bildung und Ausschüttung von IL-1 α in den Keratinozyten führt (12). Das erklärt möglicherweise zum Teil, wie es zu der bekannten Reaktion der Haut bei Sonnenbrand kommt. Auf welche Art und Weise das NALP3 die UV-Strahlen aufspürt konnte man bisher nicht herausfinden.

Eine weitere bedeutende Rolle spielen die Inflammasome bei dem allergischen Kontaktekzem (auch Kontaktallergie genannt). Es handelt sich dabei um eine entzündliche Hauterkrankung, die von verschiedenen Chemikalien verursacht werden kann, die die Haut penetrieren und sich in der Epidermis einlagern. Da diese nur unvollständige Allergene (Haptene) sind, können sie eine Immunantwort erst nach Bindung an Proteine hervorrufen. Sie induzieren eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (Typ IV nach Coombs und Gell, (117)), die in zwei Phasen abläuft. Die erste ist eine Sensibilisierungsphase, die symptomlos abläuft und in der die Chemikalie aufgenommen und den T-Zellen präsentiert wird. Bei erneutem Kontakt kommt es zu der zweiten Phase, in der die aktivierten T-Zellen in die Epidermis einwandern und eine Entzündungsreaktion verursachen. Die erste Phase verläuft abhängig von Caspase-1, IL-1 β und IL-18, was für eine Involvierung des Inflammasoms spricht. Bei Versuchen mit NALP3- und ASC-defizienten Mäusen konnte man eine abgeschwächte allergische Reaktion beobachten. Führt man jedoch voraktivierte T-Zellen ein, wurde kein Unterschied mehr im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen registriert (132). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von NALP3 nur in der Sensibilisierungsphase.

Es gibt Hinweise, dass das AIM2-Inflammasom u.a. in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) beteiligt ist. So hat man eine erhöhte Expression des HIN-200 Familienmitgliedes in Leukozyten von SLE-Patienten nachgewiesen (146). Etwa 80% der Lupus-Patienten haben eine ausgeprägte Hautsymptomatik.

Außerdem zeigen neue Forschungsergebnisse, dass in psoriatischen Läsionen eine pathologisch vermehrte Aktivierung des AIM2 Inflammasom durch zytosolischer DNA stattfindet (164).

Die intensive Erforschung der Inflammasome hat zu neuen Erkenntnissen bei mehreren sog. Autoimmunerkrankungen und sogar bei komplexen Krankheiten, die man früher gar nicht als immunologisch-bedingt betrachtet hat, beigetragen. So hat man festgestellt, dass den Cryopyrin-assoziierten Periodischen Syndromen (CAPS), der Inflammatorischen Multisystemerkrankung des Neugeborenen, dem Familial Cold Autoinflammatory Syndrome und dem Muckle-Wells-Syndrom Mutationen des NALP3-kodierenden Gens zugrunde liegen. Darüber hinaus verursachen Mutationen vom NOD2-Gen die juvenile granulomatöse Arthritis und manche Formen von Morbus Crohn. Des Weiteren sind Defekte im IL-1-Ra Gen für die Defizienz des IL-1-Rezeptor-Antagonisten verantwortlich- eine schwere Multisystem-Erkrankung, die im frühen Kindesalter ausbricht (144). Allen diesen Krankheitsbildern sind Hauterscheinungen gemeinsam, was die grundlegende Bedeutung der Inflammasome in den Hautreaktionen erneut unterstreicht.

Da das IL-1 einerseits das bedeutendste Interleukin ist, dessen Bildung und Sekretion von den Inflammasomen kontrolliert wird und andererseits auch bei den oben genannten Krankheiten eine entscheidende Rolle spielt, hat man versucht, es als Therapieansatz anzugehen. Bei den meisten Patienten liegt eine Fehlregulation des Inflammasoms vor, aus der ein IL-1-Überschuss resultiert. Dementsprechend gelingt es, eine Großzahl der Symptome durch IL-1-Blockade, z.B. mit Anakinra oder ähnlichen Präparaten mit längerer Wirkdauer,

zu lindern. Wenn man früh genug mit der Therapie beginnt, kann man sogar den krankheitstypischen Organschäden und Komplikationen vorbeugen (145). Dies setzt aber eine unverzügliche Diagnostik nach der Geburt voraus.

4.3 Wirkungen des Bienengifts auf den menschlichen Organismus

Das Bienengift ist eine farblose Flüssigkeit mit sehr komplexer Zusammensetzung. In die menschliche Haut injiziert, hat es eine direkte zytotoxische und gewebsschädigende Wirkung. Aufgrund der geringen Menge, die eine Biene abgeben kann, und des nicht außerordentlich hohen toxischen Potenzials des Giftes kann man in der Regel einige Stiche verkraften, ohne ernste Folgen davonzutragen. Ausnahmen sind Stiche an besonders empfindlichen Stellen, wie etwa im Rachen, wo das Anschwellen des Gewebes zum Blockieren der Atemwege und folgender Erstickung führen kann. Eine weitere Gefahr stellen die sog. Massenstiche- Fälle, bei denen Menschen von Hunderten von Bienen angegriffen und gestochen werden. Das sind jedoch selten auftretende Ereignisse, die statistisch nicht wesentlich zu der in Verbindung mit Bienengift stehenden Mortalität beitragen.

Ein wesentlich schwerwiegenderes Problem sind die Allergien gegen Apitoxin. Trotz der relativ hohen Anzahl an Allergikern ist die Gefährlichkeit dieser Erkrankung in der Öffentlichkeit wenig bekannt. Eine große Schwierigkeit bereitet der Mangel an zuverlässigen Screening-Methoden, mit deren Hilfe man die Wahrscheinlichkeit vorhersagen kann, mit der ein Bienen- oder Wespen-Stich bei einem Patienten mit Hymenoptera-Allergie eine anaphylaktische Reaktion auslöst (147). Die derzeit verfügbaren Untersuchungen sind Hauttests (z.B. Prick-Test) und Bestimmung der IgE-Antikörper und Trypsin im Blut. Sie können zwar eine Sensibilisierung des Patienten nachweisen, die recht häufig ist, korrelieren aber keineswegs mit der Schwere der klinischen Symptomatik. Umso wichtiger ist es, auf schon bestandene Reaktionen und Symptome nach

früheren Stichen (Atemnot, Bauchbeschwerden, Schwindel, Kreislaufprobleme, Bewusstlosigkeit) zu achten, um die gefährdeten Patienten identifizieren zu können.

Diesen Patienten kann man eine effektive, potentiell kurative Therapie anbieten: die Hyposensibilisierung (eng. VIT, venom immunotherapy). Trotz des bewiesenen Nutzens dieser Behandlung und der Erarbeitung von unterschiedlichen fein justierten Protokollen für die Durchführung ist der Mechanismus, der dahintersteckt, nicht völlig geklärt. So ist zwar bekannt, wie sich die Therapie auf die Konzentration der IgE- und IgG-Antikörper auswirkt, aber weder die Konzentration selbst, noch das Verhältnis zwischen IgG und IgE ist ein sicherer Parameter für die klinische Wirksamkeit der Hyposensibilisierung. Des Weiteren variieren die Zytokin-Antworten der T-Zellen in Abhängigkeit von dem verwendeten Protokoll (148).

4.4 Inflammasome und Bienengift

Die durch Bienengift hervorgerufenen anaphylaktischen Reaktionen stellen die gefährlichste Wirkung des Toxins dar. Entsprechend groß ist die Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen über Epidemiologie, Früherkennung und Behandlung dieser Allergie. Es fehlen jedoch weitgehend Untersuchungen über die direkten Interaktionen zwischen dem Bienengift und dem angeborenen Immunsystem. Diese Arbeit hatte das Ziel, es aufzudecken, inwieweit die Inflammasome an der Entstehung der entzündlichen Reaktion auf das Gift beteiligt sind.

4.5 Induktion von IL-1 β -Sekretion durch Bienengift

Bei der Aktivierung der verschiedenen Inflammasome führt die Signaltransduktion zu einer gemeinsamen Endstrecke, die u.a. die hydrolytische Spaltung von pro-IL-1 β und die Ausschüttung des aktiven Zytokins beinhaltet. Basierend auf dieser Tatsache wurde mit den ersten

Versuchen überprüft, ob das Bienengift in der Lage ist, Inflammasome zu aktivieren. Ein signifikanter, dosisabhängiger Konzentrationsanstieg von IL-1 β in dem Medium von NHEK Zellen, die mit Bienengift behandelt wurden, konnte nachgewiesen werden (Abbildung 7). Die Keratinozyten wurden vor der Behandlung mit TNF- α vorstimuliert, um die NF κ B abhängige Transkription von pro-IL-1 β zu induzieren. Der IL-1 β -Anstieg konnte jedoch auch ohne diese Vorbehandlung registriert werden. Somit wurden Hinweise auf eine stattfindende Aktivierung geliefert.

Durch den Einsatz verschiedener Mengen an Bienengift wurde einerseits die minimale Konzentration festgestellt, bei der die Keratinozyten IL-1 β ausschütten (1 μ g/ml) und andererseits das maximale Ausmaß der Sekretion bei hoher Toxin-Konzentration bestimmt (je nach Versuch bis 220 pg/ml).

Um dem Mechanismus, der hinter der Aktivierung steht, genauer auf den Grund zu gehen, wurde überprüft, ob die Behandlung mit dem Apitoxin die intrazelluläre pro- IL-1 β -mRNA Konzentration und somit die Transkriptionsrate des Proteins beeinflusst. Dies würde für eine Wirkung, die auf Gen-Regulation basiert, und gegen eine direkte Inflammasom-Beteiligung sprechen. Die Ergebnisse der Versuche zeigten keine Korrelation zwischen der eingesetzten Bienengift-Konzentration und der gemessenen pro- IL-1 β -Transkription (Abbildung 8). Dies erhärtete den Verdacht auf eine Prozessierung und Freisetzung des in den Zellen gespeicherten pro- IL-1 β - ein Prozess, der u.a. vom Inflammasom betätigt wird. Zu ähnlichen Ergebnissen sind Claudia Toma et al. gekommen, die die Wirkung von *V. vulnificus*- und *V. cholerae*- Toxine bei Infektion von Maus-Makrophagen untersucht haben (149).

Die Prozessierung von pro- IL-1 β in den Zellen geschieht mit Hilfe der Caspase 1- einer inflammatorischen Protease, die durch die Inflammasome aktiviert wird. Die Caspase 1 selber wird in den Zellen als inaktive Pro-Form gespeichert. Im Falle eines adäquaten Reizes, der die Inflammasom-Formierung in Gang setzt, wird nicht nur das Interleukin sezerniert, sondern zum Teil auch die aktivierte Caspase 1. Es ist unklar, ob das ein negativer

Rückkopplungsmechanismus ist, der eine überschießende Entzündungsreaktion der Zellen verhindert. Bisher wurden solche Mechanismen nur durch Inhibition von Caspase 1 beschrieben, u.a. durch Caspase 12, Pyrin, Pyrin only protein (POP1 und POP2) und beim AIM2-Inflammasom das p202 Protein (150). Die Sekretion von Caspase 1 wurde als zusätzlicher Beweis verwendet, dass eine Behandlung von Keratinozyten mit Bienengift zu einer Inflammasomaktivierung führt. Durch Western Blot-Analyse der Proteinfraction vom Zelllysat und vom Überstand konnte bei den stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen sowohl eine Zunahme der extrazellulären Caspase 1 als auch eine Abnahme der Intrazellulären nachgewiesen werden (Abbildung 11). Diese Beobachtung ist auf die Aktivität eines Inflammasomkomplexes zurückzuführen und bestätigt die vorherigen Ergebnisse der IL-1 β Sekretion in Abhängigkeit von der BV-Dosis.

4.6 Hautmodell für Bienenstiche

Mit Hilfe der Zellkultur konnten Hinweise auf eine Beteiligung des Inflammasoms bei der direkten Reaktion der Keratinozyten auf Bienengift geliefert werden. Um den Bedingungen bei einem realen Bienenstich besser nachzuahmen, wurden weitere Versuche mit einem Hautmodell durchgeführt. So konnte untersucht werden, ob das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen, die sich in der menschlichen Haut befinden, bei einer Injektion von Apitoxin zu einer ähnlichen Reaktion wie die der isolierten Keratinozyten führte. Dazu wurde ein *ex vivo*-Modell verwendet. Aus gesunder Haut wurden Stenzen gefertigt, in diese wurde Bienengift injiziert und nach einer 6-stündigen Inkubation wurde die IL-1 β Konzentration im Medium mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse deuteten auf relativ große individuelle Unterschiede in der Stärke der Reaktion, d.h. in der Menge des sezernierten IL-1 β . Die Tendenz, dass größere Mengen des Interleukins bei höheren Konzentrationen des injizierten Giftes freigesetzt wurden, konnte jedoch bei allen Hautproben (N=4) bestätigt werden (Abbildung 12). Dies entsprach den Ergebnissen der

Zellkultur und konnte als Hinweis betrachtet werden, dass das IL-1 β größtenteils von den Keratinozyten freigesetzt wurde. Ob die beobachteten Unterschiede mit der tatsächlichen Stärke der klinischen Reaktion der Patienten auf einen Bienenstich korreliert, ist unklar.

4.7 Die Toxizität von Bienengift

Die zytotoxische Wirkung des Bienengiftes ist seit längerem bekannt (70). Bei der Behandlung von Keratinozyten mit Bienengift wurde diese erneut bestätigt. Um sie genauer zu quantifizieren wurde die LDH-Aktivität im Zellmedium nach der Stimulation mit BV gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine proportionale Zunahme mit steigenden Giftdosen (Abbildung 9). Es war unklar, ob die IL-1 β -Sekretion von den absterbenden oder von den vitalen Keratinozyten stammte. Außerdem war die Art des Zelltodes unbekannt. Deswegen wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen mit Hilfe von FACS-Messungen die Diskriminierung zwischen Nekrose und Apoptose ermöglicht wurde. Hanfen Li et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Zellen, die mit 7-Bromoindirubin-3-oxim behandelt wurden und auf diese Weise in die Nekrose getrieben wurden, IL-1 β und IL-18 freisetzen (133). Das konnte auf eine Aktivierung des NALP3 Inflammasoms in den nekrotischen Zellen zurückgeführt werden. Ein ähnlicher Mechanismus war bei der Stimulation mit Apitoxin nicht ausgeschlossen.

4.8 Aktivierung des AIM2 Inflammasoms durch Bienengift

Nachdem bei den oben beschriebenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit Bienengift zu einer Inflammasomaktivierung sowohl in Keratinozyten als auch im Hautmodell führt, wurde als Nächstes überprüft, welches Inflammasom in der Reaktion beteiligt ist. Dazu wurde die Expression der Inflammasom-Rezeptoren NALP3 und AIM2, sowie des Adapter-Moleküls ASC und der Caspase 1 in NHEK Zellen mittels siRNA Transfektion

unterdrückt. Dieselbe Methode haben Kristina Rajamäki et al. in ihrer Arbeit verwendet, um zu beweisen, dass das NALP3 Inflammasom durch Cholesterol-Kristalle aktiviert wird (152).

In einem Kontrollversuch wurde nachgewiesen, dass eine signifikante Reduktion der mRNA Konzentration aller vier Zielmoleküle nach der siRNA Transfektion stattgefunden hat (Abb. 13). Am deutlichsten war diese bei der ASC siRNA (17% Restexpression) und am geringsten bei der AIM2 siRNA (55% Restexpression). Die pro- IL-1 β -Sekretion konnte durch Suppression von AIM2 und Caspase 1, aber nicht von ASC oder NALP3 gehemmt werden (Abbildung 14). Da AIM2 als ein DNA-Rezeptor bekannt ist, handelte es sich dabei wahrscheinlich um eine indirekte Reaktion, die durch das Bienengift induziert wurde. Bekannterweise wird pro- IL-1 β ausschließlich durch die Caspase 1 gespalten und dadurch aktiviert (44). Das erklärt die geringere IL-1 β -Sekretion durch Suppression des Enzyms. Eine unerwartete Beobachtung war jedoch, dass die ASC siRNA trotz guter Wirksamkeit keinen Einfluss auf die Interleukin-Ausschüttung hatte. Laut den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen kann das AIM2-Inflammasom nur mittels ASC die Caspase 1 aktivieren (69).

Es konnte in der Literatur kein Mechanismus entdeckt werden, der die Weiterleitung des Signals in der Zelle ohne diesen Adapter erklären könnte. Aus diesem Grund wurde das Ergebnis des Versuches mehrfach sorgfältig überprüft und es wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, die weitere Informationen darüber bringen sollten. Eine mögliche Erklärung dafür war, dass das ASC Protein eine längere Halbwertszeit hatte und trotz fehlender Translation nach der siRNA Transfektion noch eine ausreichende intrazelluläre Konzentration bestand. Im Western Blot konnte jedoch gezeigt werden, dass das ASC-Protein in dem Lysat der transfizierten Zellen im Unterschied zu den Kontrollzellen nicht nachweisbar war. Dieser Versuch lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass eine ASC-unabhängige Signalweiterleitung stattfand. Dieser Befund wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Das NALP3 Inflammasom war in der Reaktion der Keratinozyten auf Apitoxin offensichtlich nicht beteiligt (Abbildung 14). Dies sprach gegen die These, dass die Zellen IL-1 β ausschütteten, nur weil sie in die Nekrose getrieben wurden. Es fehlen bisher jegliche Hinweise, dass eine solche entzündliche Reaktion über das AIM2 und nicht über das NALP3 Inflammasom laufen kann.

Eine weitere mögliche Erklärung der beobachteten Ereignisse war, dass die Zellen wegen ihrer sehr starken inflammatorischen Reaktion abgestorben sind. So gehen z.B. Endothelzellen bei Behandlung mit C-reaktivem Protein (CRP), ein pro-inflammatorisches, „akute Phase“ Protein, vermehrt den Weg der Apoptose (153). Es wurden außerdem weitere Formen des Zelltodes wie Pyroptose und Autophagie beschrieben, bei denen die Caspasen eine Schlüsselrolle spielen (154). Dies würde eine mögliche Verbindung zu dem aktivierten Inflammasom in den Keratinozyten darstellen, die mit Bienengift stimuliert wurden. Im folgenden Versuch wurde deswegen überprüft, ob die Zellen vor dem Zelltod durch Ausschalten des Inflammasoms mittels siRNA Transfektion und nachfolgender BV Stimulation bewahrt werden konnten. Es zeigte sich, dass weder die Transfektion von AIM2 siRNA, noch von Caspase 1 oder ASC eine schützende Wirkung für die Zellen hatte (Abbildung 15). Demzufolge handelte es sich dabei vermutlich um zwei separate Wirkungen des Giftes- eine Inflammasom-aktivierende und eine zytotoxische. Dabei war die erste von größerem Interesse, weil das Bienengift beim Menschen bekannterweise keine größeren Gewebse Nekrosen verursacht, dafür aber wohl eine lokale Entzündungsreaktion, an der als Initiator das Aim2 Inflammasom beteiligt zu sein scheint.

Um die Wirkung des Apitoxins auf das AIM2-Inflammasom zu untersuchen, wurde als Erstes überprüft, ob extrazelluläre DNA, die z.B. von abgestorbenen Zellen stammt, in das Zellinnere gelangte und den Rezeptor aktivierte. Diese Hypothese wurde durch die Tatsache untermauert, dass Melittin Poren in der Zellmembran bilden kann, durch die die DNA Transportiert werden könnte

(137). Durch den Einsatz einer DNase wurden solche Nukleinsäurenreste so stark fragmentiert dass sie ungeeignet waren, AIM2 zu aktivieren. Die Effektivität des Verfahrens wurde im Kontrollversuch bewiesen (Abbildung 19). Es wurde kein signifikanter Unterschied in der IL-1 β Sekretion zwischen den Kontroll- und den mit DNase vorbehandelten Zellen festgestellt, wodurch diese These verworfen werden konnte (Abbildung 18). Eine weitere mögliche Erklärung war, dass die DNA aus dem Zellinneren stammte. Das Bienengift könnte ebenso durch die o.g. Poren in die Zelle gelangen, die Membranen der Mitochondrien und des Zellkerns angreifen und die dort vorhandene DNA ins Zytosol freisetzen. Diese Hypothese würde auch die beobachtete, schnell eintretende zytotoxische Wirkung erklären und ist somit als sehr wahrscheinlich zu betrachten.

Als Nächstes wurden die Wechselwirkungen zwischen den verwendeten AIM2 und ASC siRNAs untersucht. Dazu wurden die NHEK Zellen mit den beiden allein oder in Kombination transfiziert und es wurden einerseits die IL-1 β Sekretion nach Giftstimulation und andererseits die Expression der beiden Proteine gemessen. Eine überraschende Entdeckung war, dass die ASC siRNA die Expression von AIM2 stark induzierte (Abbildung 17). Das kann ein Hinweis für die Erklärung der ASC-unabhängigen Caspase 1 Aktivierung sein. Die erhöhte intrazelluläre AIM2 Konzentration nach ASC siRNA Transfektion könnte die direkte Signaltransduktion ermöglichen und so zu der Formierung eines funktionsfähigen Inflammasoms ohne ASC führen. Der genaue Mechanismus dieses Prozesses bedarf aber weiterer Erforschung.

4.9 Induktion von Apoptose durch Bienengift

Es werden unterschiedliche, zum Teil gegensätzliche Wirkungen von Bienengift auf menschliche Zellen beschrieben. Kim KH et al. konnten die durch Ethanol induzierte Apoptose von Hepatozyten durch Inkubation mit Apitoxin in einer Konzentration von 1-100 ng/ml reduzieren (155). Park JH et al. erzielten

ähnliche Ergebnisse bei Hepatozyten, die mit TNF- α oder Actinomycin D behandelt wurden.

Dahingegen konnten mehrere Arbeitsgruppen beweisen, dass Bienengift eine wachstumshemmende und zytotoxische Wirkung auf Leukämie-, Osteosarkom-, Mammkarzinom-, Melanom- und Bronchialkarzinomzellen, sowie auf die entarteten Zellen beim hepatozellulären Karzinom, hat (156)(161). Die Behandlung der oben genannten Zellen mit dem Gift in der Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ führte zum vermehrten Auftreten des programmierten Zelltodes. Dabei weisen die neoplastischen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber dieser Behandlung auf. Die Unterschiede in der Wirkung basieren wahrscheinlich auf den verschiedenen Konzentrationen, die eingesetzt wurden. Die Aktivierung des Inflammasoms war beim Einsatz des BV im $\mu\text{g/ml}$ -Bereich zu beobachten, dadurch wurde auch bei den Keratinozyten eine entsprechende Zytotoxizität festgestellt. Die dafür verwendete Methode der LDH-Messung war jedoch unspezifisch und lieferte keine Hinweise, ob es sich bei dem Zelltod um Apoptose oder Nekrose handelte (Abb. 9). Um diese Frage zu beantworten, wurden zusätzliche Messungen mit dem FACS durchgeführt (Abbildung 21). Die mit BV behandelten Zellen wurden mit Annexin V FITC/PI gefärbt, wodurch die unterschiedlichen morphologischen Merkmale der beiden Zelltod-Arten registriert werden konnten- eine bewährte Methode bei dieser Fragestellung (162). Es zeigte sich, dass die Mehrzahl der absterbenden Zellen apoptotisch war. Dies bestätigte erneut die oben beschriebene Beobachtung, dass BV in dieser Konzentration vermehrt zur Apoptose führt. Das Ausschalten des Inflammasoms durch siRNA-Transfektion hatte keinen Einfluss auf den Zelltod oder führte sogar vermehrt dazu - ein weiterer Hinweis, dass die Induktion von Apoptose und die Aktivierung des Inflammasoms auf zwei separaten Mechanismen basieren (137).

4.10 Beteiligung der einzelnen Bienengift-Bestandteile an der Aktivierung des AIM2-Inflammasoms

In dieser Arbeit wurde bereits auf die Bestandteile des Bienengifts sowie die Eigenschaften der Komponenten eingegangen. (s. 1.2). Die Hauptbestandteile: Melittin, Apamin und PLA2 sind bekannte, gut untersuchte Proteine, die bei verschiedenen wissenschaftlichen Experimenten eingesetzt werden (79),(89),(91). Es gab aber bisher keine Erkenntnisse über eine mögliche Interaktion mit dem Inflammasom. Um Hinweise hierüber zu erhalten, wurden Keratinozyten mit ganzem Bienengift, Melittin, Apamin oder PLA2 gleich lange inkubiert. Gemessen wurde die Konzentration des ausgeschütteten IL-1 β im Überstand. Es zeigte sich, dass sowohl nach zwei, als auch nach sechs und nach 24 Stunden nur die Zellen, die mit Melittin und mit ganzem Bienengift stimuliert wurden, signifikant mehr IL-1 β freigesetzt haben als die Kontrollzellen (Abbildung 22). Dies deutete darauf hin, dass nicht die Kombination der im Bienengift enthaltenen Stoffe, sondern hauptsächlich das Melittin für die inflammatorische Reaktion der Keratinozyten verantwortlich war.

Da, wie schon erwähnt, die Aktivierung des Inflammasoms nicht direkt an der Zytotoxizität des Apitoxins gekoppelt war, wurde als Nächstes mit Hilfe des Viabilität-Assays überprüft, welcher Bestandteil die Zellen am stärksten in die Apoptose trieb. Dazu wurden die Zellen mit BV als Positivkontrolle und mit Melittin, Apamin und PLA2 behandelt. Erneut wurde festgestellt, dass das Melittin das größte zytotoxische Potential hatte (Abbildung 23). Das war wahrscheinlich mit der membranlösenden Wirkung des Proteins zu erklären. Im Unterschied dazu hatten Apamin und PLA2 weder eine Auswirkung auf die Viabilität der Zellen, noch auf die Inflammasomaktivierung.

Um einen weiteren Hinweis zu liefern, dass Melittin das AIM2-Inflammasom aktiviert, wurde überprüft, wie sich die Supprimierung des AIM2- und die des ASC-Proteins durch siRNA Transfektion auf die IL-1 β -Sekretion nach Inkubation mit Bienengift und mit Melittin auswirkt. Sowohl die Wirkung des

ganzen Giftes, als auch die des Melittins konnte mit AIM2-siRNA signifikant gehemmt werden. Die ASC- und die Kontroll- siRNA hatten keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-1 β (Abbildung 24)

4.11 Bedeutung der Ergebnisse

Es konnte bewiesen werden, dass Bienengift und speziell dessen Bestandteil Melittin in der Lage ist, das AIM2-Inflammasom in menschlichen Keratinozyten zu aktivieren. Das AIM2 Inflammasom ist als ein intrazellulärer, zytosolischer DNA-Sensor bekannt und es wurde bisher noch nie berichtet, dass ein Protein es aktivieren kann. Es ist relativ unwahrscheinlich, dass dabei eine direkte Interaktion zwischen dem Melittin und dem AIM2-Rezeptor stattfindet. Möglicherweise handelt es sich um einen indirekten Aktivierungsweg, der durch intrazelluläre mitochondriale oder genomische DNA getriggert wird. In dieser Hinsicht besteht weiterer Forschungsbedarf. Das AIM2 wurde als letztes Inflammasom entdeckt und beschrieben, hat sich jedoch in jüngster Zeit als sehr bedeutungsvoll erwiesen und spielt möglicherweise bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z.B. SLE (systemischer Lupus Erythematoses), Psoriasis vulgaris und Morbus Sjögren eine große Rolle (163), (164). Weiterhin steht wahrscheinlich die Reaktion des angeborenen Immunsystems und speziell des AIM2 Inflammasoms auf Bienengift bei prädisponierten Menschen im Vorfeld der allergischen Reaktion. Die bei der Aktivierung des Inflammasoms freigesetzten Zytokine der IL-1 Familie (IL-1 β , IL-18 und IL-33) verstärken die Reaktion der CD4 und CD8 T-Zellen auf Antigene wesentlich (165). Dies geschieht durch eine direkte Stimulation von IL-1 Rezeptoren, die von den T-Zellen exprimiert werden. Außerdem vermittelt IL-33 die Induktion und Unterhaltung des anaphylaktischen Schocks (166). Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Aktivierung des Inflammasoms in Keratinozyten die Sensibilisierung auf das Apitoxin in Gang setzt und zu den schweren allergischen Reaktionen führt. Umso wichtiger ist es, die Funktionen und die Eigenschaften dieses Inflammasoms besser zu verstehen. Daraus könnte sich

in der Zukunft die Möglichkeit ergeben, neue Therapieansätze, u.a. durch Modifikation bzw. Inhibition dieses Rezeptors zu entwickeln und den Verlauf dieser Krankheiten positiv zu beeinflussen.

5 Zusammenfassung

Alle Organismen sind ständig diversen Einflüssen ihrer Umgebung ausgesetzt, darunter vielen neutralen, aber auch einer Vielzahl an schädigenden. Um sich davor zu schützen, haben sogar einfache Lebewesen Abwehrmechanismen entwickelt. Sehr früh in der Evolution, schon bei den ersten Eukaryoten, entstand das angeborene Immunsystem. Die höheren Lebewesen haben es weitgehend unverändert vererbt- ein Beweis dafür, dass es auf bewährten und effektiven Abwehrstrategien beruht. Zusätzlich dazu haben sie aber das adaptive Immunsystem entwickelt, was ihnen eine gezielte und noch effektivere Abwehr bietet. Der Mensch besitzt eine Reihe von Zellarten, Geweben und Organen, die gänzlich der Immunität dienen. So kann unser Körper nicht nur Bakterien, Viren und Pilze bekämpfen, sondern auch körpereigene Zellen bekämpfen, die geschädigt oder metaplastisch geworden sind. Diese Leistungen werden durch die Zusammenarbeit des angeborenen und des adaptiven Immunsystems vollbracht. Die Haut stellt die erste Linie des Schutzes dar. Sie ist nicht nur eine passive Barriere, sondern auch in der Lage, eindringende Schädlinge zu erkennen und eine Immunantwort einzuleiten. Daran sind die in der Haut eingebetteten Immunzellen, wie Langerhans Zellen, Dendritische Zellen u.a., aber auch die Keratinozyten beteiligt. Da die schnelle Erkennung von neuen Gefahren eine Funktion des angeborenen Immunsystems ist, finden sich in der Haut im Ruhezustand wenige Zellen des adaptiven Immunsystems. Dringt ein Mikroorganismus ein, so werden bestimmte hochkonservierte Strukturen, die er trägt, die sog. Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs), durch die Pattern-Recognition Receptors (PRRs) erkannt und gebunden. Diese Methode hat sich als so effektiv erwiesen, dass sie im Laufe der Evolution sehr wenig verändert wurde. Der Mensch besitzt verschiedene PRRs: Toll-like Rezeptoren (TLR), NOD (Nucleotide Oligomerization Domain)-like

Rezeptoren (NLR), RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) like Helicasen (RLH), C-type Lectine (16), DAI (DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors; auch DLM-1 und ZBP1 genannt), und HIN200 Rezeptoren, wie AIM2 (absent in melanoma 2). Einige, z.B. die TLRs, sind seit langem bekannt und sehr gut erforscht, wiederum andere (z.B. AIM2) wurden kürzlich entdeckt und werden zurzeit intensiv untersucht. Ein Teil der TLRs bildet bei Aktivierung große zytoplasmatische Komplexe namens Inflammasome. Die große Bedeutung der Inflammasome wird bei Mutationen der kodierenden Gene deutlich- sie sind die Ursache für verschiedene immunologische Erkrankungen wie die Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome (CAPS), die Inflammatorischen Multisystemerkrankung des Neugeborenen, die juvenile granulomatöse Arthritis und manche Formen von Morbus Crohn.

Bienengift ist eine farblose, komplex zusammengesetzte Flüssigkeit. Seine Wirkungen auf den Menschen sind sehr variabel und reichen von einer lokalen Entzündung bis zum anaphylaktischen Schock. Ein tieferer Einblick in die dahinter liegenden Mechanismen ist, einerseits, eine wichtige Voraussetzung für die bessere Behandlung der Hymenoptera-Allergie, und, andererseits, liefert er zusätzliche Erkenntnisse über das menschliche Immunsystem. Sehr wenig ist über die Interaktionen des Bienengiftes mit dem angeborenen Immunsystem bekannt. Die ersten Zellen, die nach einem Stich in Kontakt mit dem Gift kommen sind die Keratinozyten. Da sie bekannterweise auch PRRs besitzen, die Inflammasome bilden können, wurden in dieser Arbeit die Wechselwirkungen des Apitoxins mit dem Inflammasom in Keratinozyten *in vitro* und *ex vivo* untersucht.

Durch Stimulation von nHEK keratinozyten mit Bienengift konnte eine erhöhte Sekretion von IL-1 β beobachtet werden, die zu der eingesetzten Bienengift-Konzentration proportional war. Da die Reifung und Freisetzung dieses Interleukins vom Inflammasom kontrolliert wird, konnte die Freisetzung als ein Zeichen für dessen Aktivierung betrachtet werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte das Injizieren von Bienengift in menschliche Hautstanzen- ein *ex vivo*-Modell

für einen Bienenstich. Als Bestätigung der Inflammasom-Aktivierung wurde im Western-Blot von Keratinozyten eine Ausschüttung von aktivierter Caspase 1 nachgewiesen. Gleichzeitig wurde eine weitere Folge der Behandlung erkannt: ein vermehrtes Absterben der Zellen.

Durch Einsatz von siRNA konnten verschiedene Proteine supprimiert werden, die sich am Aufbau des Inflammasoms beteiligen: NALP3, AIM2, ASC und Caspase 1. Wurden die Zellen nach siRNA-Transfektion mit Bienengift inkubiert, so zeigte sich, dass AIM2 und Caspase 1 für die IL-1 β -Sekretion unentbehrlich waren, nicht aber ASC und NALP3. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass das AIM2 Inflammasom durch Apitoxin aktiviert wurde. Wie die Signaltransduktion ohne das Adapterprotein ASC stattfand, konnte nicht herausgefunden werden und bedarf weiterer Klärung. Weiterhin wurde beobachtet, dass das Ausschalten des AIM2 Inflammasoms keine Auswirkung auf das Absterben der Zellen, vermittelt durch die Zytotoxizität des BV hatte: Zellen mit AIM2 und ohne starben in gleichem Maße nach BV Behandlung ab. AIM2 ist ein DNA-Rezeptor und deswegen wurde durch den Einsatz von DNase ausgeschlossen, dass extrazelluläre DNA bei der Behandlung mit Apitoxin in die Zellen durch die vom Melittin gebildeten Poren gelangte und es aktivierte. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IL-1 β -Ausschüttung zwischen den mit DNase behandelten und den unbehandelten Zellen. Dies spricht für eine eventuelle intrazelluläre Freisetzung von DNA, die mit AIM2 interagiert.

Um genauer differenzieren zu können, ob es sich bei dem durch Bienengift induzierten Zelltod um eine Nekrose oder Apoptose handelte, wurden FACS-Versuche durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die Apoptose dominierte.

Die drei Hauptbestandteile des Apitoxins sind Melittin, Apamin und PLA2 und machen etwa 2/3 des Giftes aus. Es wurde untersucht, ob eines dieser Proteine allein für die Interleukin-Sekretion verantwortlich war, oder ob die Kombination die beobachtete Wirkung verursachte. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass das Melittin, ein Membran-lysierendes Protein, sowohl für die Aktivierung

des AIM2-Inflammasoms, als auch für die zytotoxische Wirkung des Giftes verantwortlich war.

Bei der Nicht-allergischen BV-induzierten Immunreaktion in der Haut scheint AIM2 als Initiator an erster Stelle zu stehen und dementsprechend von grundlegender Bedeutung für das Verständnis dieser Reaktion zu sein. Außerdem steht es durch die Freisetzung von IL-1 β wahrscheinlich auf dem Grund der Sensibilisierung auf das BV und der Entstehung der allergischen Reaktion.

Diese Arbeit bietet Einblicke in die Wechselwirkungen des Bienengiftes mit dem angeborenen Immunsystem des Menschen und hat zu neuen Erkenntnissen geführt, die sowohl in der immunologischen Grundlagenforschung als auch in der klinischen Behandlung der Hymenoptera-Allergie nützlich sein können. Durch eine Unterdrückung der initialen inflammatorischen Reaktion könnte man einerseits das Auslösen eines Allergischen Schockes bei einem Bienen- oder Wespenstich und andererseits die Sensibilisierung verhindern, die im Vorfeld jeder Allergie stattfindet. Um die Vorgänge komplett zu verstehen, die sich bei der Aktivierung des AIM2 Inflammasoms in den Keratinozyten nach Apitoxin-Exposition abspielen, besteht jedoch weiterer Forschungsbedarf.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

AIM2: absent in melanoma 2

AK: Antikörper

AP-1: activator protein 1

APC: Antigen präsentierende Zellen

APC: Antigenpräsentierende Zellen

ASC: apoptosis-associated speck like protein

ATP: Adenosintriphosphat

BV: bee venom

CAPS: Cryopyrin-Associated Periodic Syndrom

CARD: Caspase rekrutierende Domäne

cDNA: complementary DNA

CIITA: class II, major histocompatibility complex, transactivator

COX: Cyclooxygenase

CTB: CellTiterBlue

DAI: DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors

DAMP: danger-associated molecular patterns

DAP: Diaminopimelinsäure

DEPC: Diethylpyrocarbonat

EDGS: EpiLife Defined Growth Supplement

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

Fos: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog

HRP: Horseradish peroxidase

IFN: Interferon

IgE: Immunglobulin E

IL: Interleukin

IRF-3: Interferon regulatory factor 3

IU: international units/ internationale Einheit

JNK: c-Jun N-terminal kinase

kb: Kilobasen

kDa: Kilodalton

kg: Kilogramm

KG: Körpergewicht

l: Liter

LDH: Laktat-Dehydrogenase

LDS: Lithium Dodecyl Sulfate

LPS: Lipopolysaccharid

LPS: Lipopolysacchariden

LRRs: leucine rich repeats

M: Molar

MCD: Mast Cell Degranulating Peptide

MEK: extracellular regulated kinase

MEK: MAP-ERK kinase 1/2

MES: medium size

MHC: Major Histocompatibility complex

MHC: Major histocompatibility complex

min: Minute

ml: Milliliter

mm: Millimeter

mM: Millimolar

mmol/24h: Millimol pro 24 Stunden

MRJP9: major royal jelly protein

mRNA: messenger Ribonukleinsäure

n.s.: nicht signifikant

n: Anzahl

NACHT: domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP-1

NaCl: Natriumchlorid/Kochsalz

NBD: nucleotide-binding domain

NF κ B: nuclear factor kappa von aktivierten B-Zellen

NF κ B: nuclear factor- κ B

ng: Nanogramm

NHEK: normal human epidermal Keratinocyte / primäre humane epidermale Keratinozyten

NK-Zellen: natural killer

NLR: NOD-like Rezeptoren

NLRP oder NALP: Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing

nm: Nanometer

nM: Nanomolar

NOD: Nucleotide Oligomerization Domain-

o.g.: oben genannt

o.g.: oben genannte

PAMP: pathogen-associated molecular patterns

PBGD: Porphobilinogen-Deaminase

PBS: phosphate buffered saline

PLA₂: Phospholipase A₂

PMSF: phenylmethanesulfonylfluoride

PRR: pattern recognition receptors

PVDF: Polyvinylidene Fluoride

PVF-1: PDGF- and VEGF-related factor 1

PYD: Pyrid- Domäne

RIG-I: retinoic acid-inducible gene-I

RIP2 Kinase: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer

RLH: RIG-I-like Helicasen

SDS: sodium dodecyl sulfate

sek: Sekunde

siRNA: small interfering RNA

SK Kanäle: small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels

sog.: so genannte

STAND NTPasen: signal transduction ATPases with numerous domains

Tab.: Tabelle

TAE: Tris-Acetat-EDTA

TBS: Tris-buffered Saline

TLR: Toll-like Rezeptoren

TMB: Tetramethylbenzidin

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha

u.a.: unter anderem

U/min: Umdrehungen pro Minute

V: Volt

ZNS: Zentralnervensystem

μ g: Mikrogramm

μ l: Mikroliter

7 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: TLR Signalwege in Makrophagen und Dendritischen Zellen | 11 |
| Abbildung 2: Strukturelle Organisation ausgewählter NOD-like Rezeptoren | 14 |
| Abbildung 3: Das AIM2 Inflammasom | 19 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Reaktionsgefäßes nach der Zentrifugation | 33 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der Detektion von Apoptose | 41 |
| Abbildung 6: FACS Messung der doppeltgefärbten Zellen | 42 |
| Abbildung 7: IL-1 β Sekretion von NHEK | 44 |
| Abbildung 8: relative mRNA Expression von pro- IL-1 β | 45 |
| Abbildung 9: Relative Zytotoxizität | 46 |
| Abbildung 10: Relative Zelldichte | 47 |
| Abbildung 11: Caspase 1 Sekretion von NHEK im Western Blot | 48 |
| Abbildung 12: IL-1 β Sekretion von Hautstanzen nach Stimulation mit Bienengift in einem Ex vivo Hautmodell | 49 |
| Abbildung 13: HE-gefärbter Schnitt einer Hautstanze nach Injektion von Apitoxin | 50 |
| Abbildung 14: Relative Expression von AIM2, Caspase 1 und ASC nach siRNA Transfektion | 51 |
| Abbildung 15: Hemmung der IL-1 β -Sekretion durch Ausschalten von Inflammasombestandteilen mittels siRNA-Transfektion | 52 |
| Abbildung 16: Relative Zytotoxizität | 53 |
| Abbildung 17: ASC Expression nach siRNA Transfektion | 54 |
| Abbildung 18: IL-1 β Sekretion bei Behandlung mit Bienengift und DNase | 56 |
| Abbildung 19: Effektivität der DNase in EpiLife | 57 |
| Abbildung 20: IL-1 β Sekretion und relative Expression von AIM2 und ASC bei Behandlung mit siRNA | 59 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 21: IL-1 β Sekretion und Anteil der apoptotischen Zellen von der Gesamtpopulation nach CO3, AIM2, ASC und Caspase 1 siRNA Transfektion und Bienengift Applikation | 61 |
| Abbildung 22: IL-1 β Sekretion nach Stimulation mit Bienengift-Bestandteile | 63 |
| Abbildung 23: Zellviabilität nach Behandlung mit Bienengift und Bestandteilen | 64 |
| Abbildung 24: IL-1 β Sekretion nach siRNA Transfektion und Bienengift/Melittin Stimulation | 65 |
| | |
| Tabelle 1: Pattern Recognition Receptors und ihre Liganden | 10 |
| Tabelle 2: Bestandteile des Bienengifts in Vol% von der Trockensubstanz | 23 |
| Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten siRNAs | 29 |
| Tabelle 4: qRT-PCR Protokoll für die Messung der Genexpression im LightCycler | 34 |

8 Literaturverzeichnis

- (1) Metz M, Maurer M. 2009: Innate immunity and allergy in the skin. *Curr. Opin. Immunol.* 6:687-93.
- (2) Schaubert J, Gallo RL. 2008: Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol*, 122:261-266.
- (3) Kobayashi M, Yoshiki R, Sakabe J, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y. 2009: Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *Br J Dermatol*, 160:297-304.
- (4) Neuberger MS. 2008: Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol Cell Biol.*, 86(2):124-32
- (5) Hilleman, M.R. 2000: Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine* 18, 1436–1447.
- (6) Arvin, A.M. and Greenberg, H.B. 2006: New viral vaccines. *Virology* 344, 240–249.
- (7) Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2004: WHO vaccine-preventable diseases - Global Summary.
- (8) Anna Bagorda, Carole A. Parent. 2008: Eukaryotic chemotaxis at a glance. *J. Cell Science*, 121 (Pt 16): 2621–4
- (9) Stephens L, Milne L, Hawkins P. 2008: Moving towards a better understanding of chemotaxis. *Current Biology*, 18(11):R485-94.
- (10) Matzinger P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301–5
- (11) 6. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity. 2004: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Review Immunology*, 4:469–78

-
- (12) Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. 2008: Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, (8):847-56
- (13) Gay, N.J. and Gangloff, M. 2007: Structure and function of toll receptors and their ligands. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 141–165
- (14) Franchi, L. et al. 2009: Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological reviews* 227, 106–128
- (15) Takeuchi, O. and Akira, S. 2008: MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 17–22
- (16) Huysamen, C. and Brown, G.D. 2009: The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors. *FEMS Microbiol. Lett* 290, 121–128
- (17) Takaoka, A. et al. 2007: DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501–505
- (18) Hornung, V. et al. 2009: AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514–518
- (19) Monie, T.P. et al. 2009: Structure and regulation of cytoplasmic adapter proteins involved in innate immune signaling. *Immunological reviews* 227, 161–175
- (20) Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. 1985: Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42:791–8
- (21) Anderson KV, Nüsslein-Volhard C. 1984: Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311:223–7
- (22) Himanshu Kumar, Taro Kawai and Shizuo Akira. 2009: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 388(4):621-5
- (23) Gay NJ, Gangloff M. 2007: Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*. 76:141–65

- (24) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, et al. 2004: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*. 5:730–37
- (25) Sumpter R, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, et al. 2005: Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79:2689–99
- (26) Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, et al. 2004: The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- β promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17264–69
- (27) Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, et al. 2005: Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437:1167–72
- (28) McWhirter, S.M., Tenoever, B.R., and Maniatis, T. 2005: Connecting mitochondria and innate immunity. *Cell* 122, 645–647.
- (29) Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., and Chen, Z.J. 2005: Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signalling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell* 122, 669–682.
- (30) Martinon F, Tschopp J. 2005: NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26:447–54
- (31) Kufer T, Fritz JH, Philpott DJ. 2005: NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* 13:381–88
- (32) Tanabe, T. et al. 2004: Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.* 23, 1587– 1597
- (33) Hsu, L.C. et al. 2008: A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7803–7808
- (34) Dostert, C. et al. 2008: Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674–677
- (35) Halle, A. et al. 2008: The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat. Immunol.* 9, 857–865

- (36) Kool, M. et al. 2008: Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol.* 181, 3755–3759
- (37) Muruve, D.A. et al. 2008: The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452, 103–107
- (38) Petrilli, V. et al. 2007: Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 14, 1583–1589
- (39) Cassel, S.L. et al. 2008: The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9035–9040
- (40) Eisenbarth, S.C. et al. 2008: Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122–1126
- (41) Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. 2008: Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 9(8):847-56
- (42) Brodsky I, Medzhitov R. 2007: Two modes of ligand recognition by TLRs. *Cell* 130:979–81
- (43) Ting, J.P.Y., et al. 2008: The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 28:285–287.
- (44) Martinon F, Mayor A, Tschopp J. 2009: The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 27:229-65.
- (45) Tattoli I, Travassos L, Carneiro LA, Magalhaes J, Girardin S. 2007: The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin. Immunopathol.* 29:289–301
- (46) Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. 2009: AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature.* 458:509–513.
- (47) Thornberry, N.A., et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 356:768–774.

- (48) Gu, Y., et al. 1997. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science*. 275:206–209.
- (49) Cayrol, C., and Girard, J.-P. 2009: The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:9021–9026.
- (50) Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Gabay, C., and Palmer, G. 2009: Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J. Biol. Chem.* 284:19420–19426.
- (51) Goldbach-Mansky R, Kastner DL. 2009: Autoinflammation: the prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses. *J Allergy Clin Immunol*. 124(6):1141-9
- (52) Shao, W., Yeretssian, G., Doiron, K., Hussain, S.N., and Saleh, M. 2007: The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J. Biol. Chem.* 282:36321–36329.
- (53) Lamkanfi, M., et al. 2008: Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol. Cell Proteomics*. 7:2350–2363.
- (54) Fink, S.L., and Cookson, B.T. 2006: Caspase-1- dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 8:1812–1825.
- (55) Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., and van der Goot, F.G. 2006: Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*. 126:1135–1145.
- (56) Keller, M., Ruegg, A., Werner, S., and Beer, H.D. 2008: Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 132:818–831.
- (57) Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA et al. 2009: Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 183:787-791.
- (58) Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. 1998: The Ifi 200 genes: an emerging family of IFN-inducible genes. *Biochimie* 80:721–728

- (59) Burckstummer, T. et al. 2009: An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* 10, 266–272
- (60) Fernandes-Alnemri, T. et al. 2009: AIM2 activates the Inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509–513
- (61) Fernandes-Alnemri T et al. 2010: The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 11:385–393
- (62) Rathinam VA et al. 2010: The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11:395–402
- (63) Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, Hornung V (2010) *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 40:1545–1551
- (64) Choubey D, Walter S, Geng Y, Xin H. 2000: Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family. *FEBS Lett.* 474:38–42.
- (65) Chen IF, Ou-Yang F, Hung JY, Liu JC, Wang H, Wang SC, Hou MF, Hortobagyi GN, Hung MC. 2006: AIM2 suppresses human breast cancer cell proliferation in vitro and mammary tumor growth in a mouse model. *Mol Cancer Ther.* 5:1–7.
- (66) Kulaeva OI, Draghici S, Tang L, Kraniak JM, Land SJ, Tainsky MA. 2003: Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. *Oncogene.* 22:4118–27.
- (67) Georgios Patsos, Anja Germann, Johannes Gebert, Susanne Dihlmann. 2009: Restoration of absent in melanoma 2 (AIM2) induces G2/M cell cycle arrest and promotes invasion of colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer.* 126, 1838–1849
- (68) Roberts TL et al. 2009: HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323:1057–1060
- (69) Franz Bauernfeind, Andrea Ablasser, Eva Bartok, Sarah Kim, Jonathan Schmid-Burgk, Taner Cavlar, Veit Hornung. 2011: Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 68(5):765–83.

- (70) Young Joon Lee, Su Jin Kang, Byeong Mo Kim, Yang Jee Kim, Hae Dong Woo, Hai Won Chung. 2007: Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions* 169:189–197
- (71) Kwon, Y.B., Lee, H.J., Han, H.J., Mar, W.C., Kang, S.K., Yoon, O.B., Beitz, A.J., Lee, J.H., 2002: The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sci.* 71(2),191–204.
- (72) Kwon, Y.B., Lee, J.D., Lee, H.J., Han, H.J., Mar, W.C., Kang, S.K., Beitz, A.J., Lee, J.H., 2001: Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain* 90 (3), 271–280.
- (73) Kwon, Y.B., H.W. Kim, T.W. Ham, S.Y. Yoon, D.H. Roh, H.J. Han, A.J. Beitz, I.S. Yang, J.H. Lee. 2003: The anti-inflammatory effect of bee venom stimulation in a mouse air pouch model is mediated by adrenal medullary activity, *J. Neuroendocrinol.* 15, 93–96.
- (74) Moon DO, Park SY, Lee KJ, Heo MS, Kim KC, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Kim GY.2007: Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia.*Int Immunopharmacol.*7(8):1092-101.
- (75) Karl M. Stuhlmeier. 2007: *Apis Mellifera* Venom and Melittin Block neither NF-B-p50-DNA Interactions nor the Activation of NF-B, Instead They Activate the Transcription of Proinflammatory Genes and the Release of Reactive Oxygen Intermediates1. *J. Immunol.* 179;655-664
- (76) H.W. Kim,Y.B.Kwon, T.W. Ham, D.H. Roh, S.Y.Yoon, H.J. Lee, H.J. Han, I.S. Yang, A.J. Beitz, J.H. Lee. 2003: Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord Fos expression in rats, *J. Vet. Med. Sci.* 65:349–355
- (77) D.H. Roh, Y.B. Kwon, H.W. Kim, T.W. Ham, S.Y. Yoon, S.Y. Kang, H.J. Han, H.J. Lee, A.J. Beitz, J.H. Lee. 2004: Acupoint stimulation with diluted bee venom (apipuncture) alleviates thermal hyperalgesia in a rodent neuropathic pain model: involvement of spinal alpha2-adrenoceptors, *J. Pain* 5:297–303.
- (78) Meier J, White J. (1995). *Clinical toxicology of animal venoms and poisons*. CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-4489-1.

- (79) H. Sumikura, O.K. Andersen, A.M. Drewes, L. Arendt-Nielsen. 2003: A comparison of hyperalgesia and neurogenic inflammation induced by melittin and capsaicin in humans, *Neurosci. Lett.* 337:147–150.
- (80) D. Wade, A. Boman, B. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman, R.B. Merrifield. 1990: All-D amino acid-containing channelforming antibiotic peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:4761–4765.
- (81) Klotz SA, Gaur NK, Rauceo J, Lake DF, Park Y, Hahm KS, Lipke PN. 2004: Inhibition of adherence and killing of *Candida albicans* with a 23-Mer peptide (Fn/23) with dual antifungal properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48(11):4337-41
- (82) Lazarev VN, Shkarupeta MM, Titova GA, Kostjukova ES, Akopian TA, Govorun VM. 2005: Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* infections in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 338(2):946-50. PMID 16246304
- (83) Lazarev VN, Stipkovits L, Biro J, Miklodi D, Shkarupeta MM, Titova GA, Akopian TA, Govorun VM. 2004: Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Microbes and Infection.* 6(6):536-41
- (84) Lazarev VN, Parfenova TM, Gularyan SK, Misyurina OY, Akopian TA, Govorun VM. 2002: Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in a HeLa cell line. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 19(2):133-7
- (85) Soman NR, Baldwin SL, Hu G, Marsh JN, Lanza GM, Heuser JE, Arbeit JM, Wickline SA, Schlesinger PH. 2009: Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *J Clin Invest.* 119(9):2830-42
- (86) E. Habermann. 1972: Bee and wasp venom: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed, *Science* 177:314–322.
- (87) Cox, Michael; Nelson, David R.; Lehninger, Albert L. 2005: *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 0-7167-4339-6.

- (88) Gutiérrez JM, Ownby CL. 2003: Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 42(8):915-31.
- (89) Petroianu G, Liu J, Helfrich U, Maleck W, Rüfer R. 2000: PLA2-induced coagulation abnormalities after bee sting. *Am J Emerg Med*. 18(1):22-7.
- (90) Habermann E. 1984: Apamin. *Pharmacol Ther*. 25(2):255-70.
- (91) Faber ES. 2009: Functions and modulation of neuronal SK channels. *Cell Biochem Biophys*. 55(3):127-39.
- (92) Saravanan R, King R, White J (April 2004). "Transient claw hand owing to a bee sting. A report of two cases". *J Bone Joint Surg Br* 86 (3): 404–5
- (93) Maltzman JS, Lee AG, Miller NR. 2000: Optic neuropathy occurring after bee and wasp sting. *Ophthalmology*. 107:193-5.
- (94) Law DA, Beto RJ, Dulaney J, et al. 1997: Atrial flutter and fibrillation following bee stings. *Am J Cardiol*. 80:1255.
- (95) Shkenderov, S., & Koburova, K. 1982: Adolapin-a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon* 20(1), 317–321.
- (96) Koburova, K. L., Michailova, S. G., & Shkenderov, S. V. 1985: Further investigation on the anti-inflammatory properties of adolapin-bee venom polypeptide. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 11(2), 50–55.
- (97) Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases. 2006: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*; 106:818–39.
- (98) Buku, A. 1999: Mast cell degranulating peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. *Peptides* 20(3), 415–420.
- (99) Mousli, M., Bueb, J. L., Bronner, C., Rouot, B., & Landry, Y. 1990: G protein activation: a receptor independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides, and venom peptides. *Trends Pharmacol Sci* 11(9), 358–362.
- (100) Billingham, M. E. J., Morley, J., Hanson, J. M., Shipolini, E. A., & Vernon, C. A. 1973: An anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature* 245(5421), 163–164.

- (101) Hanson, J. M., Morley, J., & Soria-Herrera, C. (1974). Anti-inflammatory property of 401 (MCD peptide) a peptide from the venom of bee *Apis mellifera* (L.). *Br J Pharmacol* 50(3), 383–392.
- (102) Buku, A., Price, J. A., Mendlowitz, M., & Masur, S. (2001). Mast cell degranulating peptide binds to RBL-2H3 mast cell receptors and inhibits IgE binding. *Peptides* 22(12), 1993–1998.
- (103) Dong Ju Son ,Jae Woong Lee ,Young Hee Lee ,Ho Sueb Song, Chong Kil Lee ,Jin Tae Hong. 2007: Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics* 115, 246–270
- (104) Dotimas, E.M., and R.C. Hider. 1987: Honeybee venom. *Bee World*, 68(2): 51–70.
- (105) SHIPOLINI, R, A. 1984: Biochemistry of Bee Venom. II/sect Poisons. Allergens and other Invertebrate Venoms; Vol. 2. of: Handbook of Natural Toxins, pp.49-85. (Tu, A. T., Ed.). New York: Dekker.
- (106) Fitzgerald KT, Flood AA, 2006: Hymenoptera stings. *Clin Tech Small Anim Pract.* 21(4):194-204
- (107) Betten DP, Richardson WH, Tong TC, Clark RF. 2006: Massive honey bee envenomation-induced rhabdomyolysis in an adolescent. *Pediatrics.* 117(1):231-5.
- (108) De Roodt AR, Salomón OD, Orduna TA, Robles Ortiz LE, Paniagua Solís JF, Alagón Cano A. 2005: Poisoning by bee sting. *Gac Med Mex.* 141(3):215-22.
- (109) Daher Ede F, da Silva Júnior GB, Bezerra GP, Pontes LB, Martins AM, Guimarães JA. 2003: Acute renal failure after massive honeybee stings. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 45(1):45-50.
- (110) Bourgain C, Pauti MD, Fillastre JP, Godin M, François A, Leroy JP, Droy JM, Klotz F. 1998: Massive poisoning by African bee stings. *Presse Med.* 27(22):1099-101.
- (111) Reisman RE. 2002: Allergy to stinging insects. In *Patterson's Allergic Diseases*, 6th ed. Grammer LC, and Greenberger PA (Eds). Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 225–237.
- (112) Lazoglu AH, Boglioli LR, Taff ML, Rosenbluth M, Macris NT. 1995: Serum sickness reaction following multiple insect stings. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 75(6 Pt 1):522-4.

- (113) Reisman RE. 1991: Unusual reactions to insect venoms. *Allergy Proc.* 12(6):395-9.
- (114) Bilo` BM, Bonifazi F. 2008: Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 8:330-7.
- (115) Moffitt JE, Golden DB, Reisman RE et al. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:869-86.
- (116) Graft DF. Insect sting allergy. 2006: *Med Clin North Am*; 90:211-32.
- (117) Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A. 1963: The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Science
- (118) King, T. P., Sobotka, A. K., Kochoumian, L., and Lichtenstein, L. M. 1976: Allergens of honey bee venom. *Arch Biochem Biophys* 172, 661-671.
- (119) Hoffman, D. R. and Shipman, W. H. 1976: Allergens in bee venom. I. Separation and identification of the major allergens. *J Allergy Clin Immunol* 58, 551-562.
- (120) Paull, B. R., Yunginger, J. W., and Gleich, G. J. 1977: Melittin: an allergen of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 59, 334-338.
- (121) Hoffman D. 2006: Hymenoptera venom allergens. *Clin Rev Allergy Immunol* 30:109-28.
- (122) PeirenN, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ. 2005: The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta.* 1752:1-5.
- (123) Peiren N, de Graaf DC, Vanrobaeys F, Danneels EL, Devreese B, Van Beeumen J, et al. 2008: Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon.* 52:72-83.
- (124) Golden DB, Schwartz HJ. Guidelines for venom immunotherapy. 1986: *J Allergy Clin Immunol*; 77:727-8.
- (125) Moffitt JE, Golden DB, Reisman RE et al. 2004: Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol.* 114:869-86.

- (126) Rodríguez-Pérez N, Penagos M, Portnoy JM. 2008: New types of immunotherapy in children. *Curr Allergy Asthma Rep.* 8(6):484-92.
- (127) Feldmann J, Prieur AM, Quartier P et al. 2002: Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet.* 71:198-203.
- (128) Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. 2001: Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet.* 29:301-5.
- (129) Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD et al. 2009: In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J ExpMed.* 206:1029-36.
- (130) Nakamura Y, Kambe N, Saito M et al. 2009: Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *J ExpMed*;206:1037-46.
- (131) Watanabe H, Gaide O, Petrilli V et al. 2007: Activation of the IL 1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 127:1956-63.
- (132) Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M et al. 2006: Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity.* 24:317-27.
- (133) Li H, Ambade A, Re F. 2009: Cutting edge: Necrosis activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol.* 183:1528-32.
- (134) Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ et al. 2009: Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:20388- 93.
- (135) Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. 2008: NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol.* 8:372-9.
- (136) Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W et al. 2007: Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe.* 2:147-59.
- (137) K Matsuzaki, S Yoneyama, and K Miyajima. 1997: Pore formation and translocation of melittin. *Biophys J.* 73(2): 831-838.

- (138) Gerhard Deutschmann: Die Haut und ihre Anhangsgebilde. Springer Wien 2005, ISBN 3-211-83670-5.
- (139) Tom P. Monie, Clare E. Bryant and Nicholas J. Gay 2009: Activating immunity: lessons from the TLRs and NLRs. *Trends Biochem Sci.* 34(11):553-61
- (140) Apostolopoulos V, McKenzie IF. 2001: Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr. Mol. Med.* 1 (4): 469-74.
- (141) Wang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen L, Pi LY, Zhang S, Zhang Z, Fauquet C, Gaut BS, Whalen MC, Ronald PC. 1998: Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* 10 (5): 765-79
- (142) Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. 2008: Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3:352-63
- (143) Freche B, Reig N, Van Der Goot FG. 2007: The role of the inflammasome in cellular responses to toxins and bacterial effectors. *Semin. Immunopathol.* 29:249-60
- (144) Raphaela Goldbach-Mansky, Daniel L. Kastner. 2009: Autoinflammation: The prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses. *J Allergy Clin Immunol.* 124(6):1141-9
- (145) Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, et al. 2006: Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med.* 355:581-92.
- (146) Kimkong I, Avihingsanon Y, Hirankarn N. 2009: Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR. *Lupus.* 18:1066-72.
- (147) Simons FE. 2010: Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 125(2 Suppl 2):S161-81.
- (148) Beatrice M. Bilo` and Floriano Bonifazi. 2007: Advances in hymenoptera venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:567-573.

- (149) Toma C, Higa N, Koizumi Y, Nakasone N, Ogura Y, McCoy AJ, Franchi L, Uematsu S, Sagara J, Taniguchi S, Tsutsui H, Akira S, Tschopp J, Núñez G, Suzuki T. 2010: Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *J Immunol.* 184(9):5287-97.
- (150) Guarda G, So A. 2010: Regulation of inflammasome activity. *Immunology.* 130(3):329-36.
- (151) Ruëff F, Jappe U, Przybilla B. 2010: Standards and pitfalls of in-vitro diagnostics of Hymenoptera venom allergy. *Hautarzt.* [Epub ahead of print]
- (152) Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. 2010: Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One.* 5(7):e11765.
- (153) Guo S, Meng S, Chen B, Liu J, Gao L, Wu Y. 2010: C-Reactive Protein Can Influence the Proliferation, Apoptosis, and Monocyte Chemotactic Protein-1 Production of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *DNA Cell Biol.* [Epub ahead of print]
- (154) Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. 2010: Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. *Toxicol Sci.* [Epub ahead of print]
- (155) Kim KH, Kum YS, Park YY, Park JH, Kim SJ, Lee WR, Lee KG, Han SM, Park KK. 2010: The protective effect of bee venom against ethanol-induced hepatic injury via regulation of the mitochondria-related apoptotic pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 107(1):619-24.
- (156) Chu, S.T., Cheng, H.H., Huang, C.J., Chang, H.C., Chi, C.C., Su, H.H., Hsu, S.S., Wang, J.L., Chen, I.S., Liu, S.I., Lu, Y.C., Huang, J.K., Ho, C.M., Jan, C.R. Jan 2007: PLA2-independent Ca²⁺ entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Sci.* 80, 364.
- (157) Li, B., Gu, W., Zhang, C., Huang, X.Q., Han, K.Q., Ling, C.Q. 2006: Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 induced by melittin. *Onkologie* 29, 367.
- (158) Moon, D.O., Park, S.Y., Heo, M.S., Kim, K.C., Park, C., Ko, W.S., Choi, Y.H., Kim, G.Y. 2006: Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int. Immunopharmacol.* 6, 1796.

- (159) Orsolic, N., Sver, L., Verstovsek, S., Terzic, S., Basic, I. 2003: Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon* 41, 861.
- (160) Hong, S.J., Rim, G.S., Yang, H.I., Yin, C.S., Koh, H.G., Jang, M.H., Kim, C.J., Choe, B.K., Chung, J.H. 2005: Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon* 46, 39.
- (161) Liu, X., Chen, D., Xie, L., Zhang, R. 2002: Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1083.
- (162) Bedner, E. 1999: Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35, 181-195.
- (163) Mondini M, Vidali M, Airò P, De Andrea M, Riboldi P, Meroni PL, Gariglio M, Landolfo S. 2007: Role of the interferon-inducible gene IFI16 in the etiopathogenesis of systemic autoimmune disorders. Department of Public Health and Microbiology, Medical School, University of Turin, V. Santena 9, 10126, Turin, Italy.
- (164) Yvonne Dombrowski, Mark Peric, Sarah Koglin, Claudia Kammerbauer, Christine Göß, David Anz, Maren Simanski, Regine Gläser, Jürgen Harder, Veit Hornung, Richard L. Gallo, Thomas Ruzicka, Robert Besch, Jürgen Schaubert. 2011: Cytosolic DNA Triggers Inflammasome Activation in Keratinocytes in Psoriatic Lesions. *Sci Transl Med.* 3(82):82ra38.
- (165) Ben-Sasson, Stephane Caucheteux, Michelle Crank, Jane Hu-Li, William E. Paul. 2011: IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine* 56, 122–125.
- (166) Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, Liew FY, Melendez AJ. 2009: The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(24):9773-8.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Priv. Doz. Dr. Jürgen Schaubert für seine umfassende und stets zuverlässige Betreuung danken. Seine engagierte Betreuung und seine wertvollen Ratschläge waren für das Entstehen dieser Arbeit von großer Bedeutung.

Großer Dank gilt auch Dr. Yvonne Dombrowski für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche und für die Korrekturarbeiten. Ihre Unterstützung, ihr fundiertes Wissen und die freundschaftliche Zusammenarbeit haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka danke ich für die Möglichkeit in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie zu arbeiten.

Dr. Marc Peric danke ich für seine mit Rat und Tat die Laborarbeit begleitende Unterstützung.

Sarah Koglin und dem Team des Labors möchte ich für die Hilfe und Geduld bei zahlreichen Versuchstechnischen Problemen danken.

Herzlichen Dank auch an Prof. Przybilla für die Bereitstellung der benötigten Bienengiftzubereitungen.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre Unterstützung außerhalb des Labors, sowie für die gesamte Zeit des Studiums.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin Kalina, die mir während des Studiums ununterbrochen beistand, bei wichtigen Entscheidungen half und mich ermutigte.

